

19980849

報告書 P. 58－65は下記に掲載

Expression of Cell Cycle-Related Genes in Dying Cells in Retinal Ischemic Injury

Sachiko Kuroiwa, Naomichi Katai, Hiroto Shibuki, Toru Kurokawa, Junichi Umibira, Toshio Nikaido, Kiyokazu Kametani, and Nagahisa Yoshimura
Investigative Ophthalmology & Visual Science. Volume 39 Number 3,
pp.610-617, 1998

19980849

報告書 P. 66—73は下記に掲載

Protective Effect of Adult T-Cell Leukemia-Derived Factor on Retinal Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat

Hiroto Shibuki, Naomichi Katai, Sachiko Kuroiwa, Toru Kurokawa, Junji Yodoi, and Nagahisa Yoshimura

Investigative Ophthalmology & Visual Science. Volume 39 Number 8, pp.1470-1477, 1998

ウノプロストン点眼液のラット光照射網膜変性に対する保護効果

Protective effects against light damage by topical application

with isopropyl unoprostone ophthalmic solution

緋田芳樹、真島行彦、小口芳久（慶應大眼科）

YOSHIKI HIIDA, YUKIHIKO MASHIMA, YOSHIHISA OGUCHI

(Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine)

抄録

ウノプロストン（レスキュラ®）点眼液の視細胞への光障害保護効果を調べるために、ラット光照射網膜変性モデルを用いた。動物はSprague-Dawley系ラット雄10-11週齢を用い、4日間1000~1200 Luxの連続光を照射した。1群を基剤点眼群（n=20）、もう1群をウノプロストン点眼群（n=20）とした。パラフィン切片を作成し、H-E染色した後、光学顕微鏡にて外顆粒層の厚さを計測し、視細胞の残存数の指標とした。ウノプロストン点眼群は基剤点眼群に比べ、外顆粒層の厚みの減少が、約11%減少しており、統計学的にも有意差を認めた（Student's t testにて $P < 0.01$ ）。ウノプロストン点眼液は本邦にては緑内障に対して用いられているが、光障害に対する視細胞の保護効果も有意に存在した。このことは、今後視細胞の光障害に対する薬剤の開発に重要な示唆を与えるものと考えられる。

To evaluate the effect of the treatment by topical application of isopropyl unoprostone ophthalmic solution (unoprostone, Rescula[®]) against light damage to the retinal photoreceptor.

Two groups of Sprague-Dawley rats were kept in constant light at an illuminance of 1000-1200 lux for 4 days. One group (n=20) was treated with unoprostone and the other (n=20) was treated with the vehicle as for the reference group. The paraffin sections prepared for light-microscopy were stained with hematoxylin-eosin (HE). To evaluate photoreceptor cell damage, we used the outer nuclear cell thickness measurement at nasal side from the optic disk. Two groups were statistically tested and the group treated with unoprostone retained more photoreceptor than the reference group (student's t-test, $p < 0.01$). Light protective effect of topical application with unoprostone is observed, unoprostone is widely used as a new type of medicine for glaucoma in Japan. The result may give us a suggestion to develop light effective agents to the photoreceptor.

Key Words: unoprostone, topical application, photoreceptor, light damage

要旨

ウノプロストン点眼薬（レスキュラ®）は本邦で開発されたプロスタグランジン系の抗緑内障点眼薬である。臨床的に眼圧を下げるだけでなく、眼血流量を増やすことも確認されている（報告多数）。当薬剤の投与によって視野が改善される症例が散見されることについては複数の施設で確認されており、視神経の血流量の増加によるものではないかと考えられていた。今回我々は、視神経のみならず、視細胞に対する影響を検索するために、ラット網膜光障害のモデルをもちいたので、報告する。

試験方法

SD(Sprague Dawley)系ラット、9-10週齢を一週間、約300Lux、明暗12時間で育成した後、1000Lux、4

日間連続光照射を行った。試験群は基剤点眼群（10匹、20眼）、ウノプロストン点眼群（10匹、20眼）にわけた。点眼は、基剤点眼及びウノプロストン0.12%各5（マイクロ）lを、連続光照射前2日間と連続光照射期間4日間の計6日間、一日3回（10：00、13：00、16：00）に、両眼に行った。連続光照射翌日にバイポーラで耳側をマーキングした両眼を摘出し、固定液（2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、リン酸緩衝液）に2.5時間浸透させた後、角膜を除去し、さらに1晩追加固定を行った。脱水処理後眼球が水平になるようにパラフィン包埋し、ミクロトームにて、3（マイクロ）m厚の切片を作成した。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、視神経乳頭部を含む網膜の組織標本を1眼につき3枚づつ作成した。100倍光学顕微鏡にて、視

神経乳頭より約700 (マイクロ) m 鼻側の網膜の外顆粒層の厚さを計測し、視細胞数の指標とした。

試験結果

基剤点眼群にては平均値(+)-SDが 22.3(+)-3.2 (マイクロ) m、ウノプロストン点眼群にては、25.5(+)-3.9 (マイクロ) m であり、Student's t test にて危険率1%でウノプロストン点眼群に有意な外顆粒層の残存を認めた。(図1参照) 予備実験における正常な外顆粒層の厚さが51.5(+)-3.0 (マイクロ) m (n=6)であることを考えると、光障害に対する阻止率は、 $(25.5-22.3)/(51.5-22.3)$ とすると約11%であった。

考案

現在までに点眼による網膜光障害に対する保護効果のある物質の報告はない。内服によるものは視細胞外節の形成を阻害するもので、医薬品としては応用困難である。今回我々が用いた実験系は、太陽の直射光や、手術顕微鏡による強い光の障害と言うよりも、むしろ慢性的な視細胞に対する光障害のモデルに近い。これらに関連する網脈絡膜疾患としては、老人性黄斑変性や、網膜色素変性などが考えられている。これらの疾患が非常に慢性的であることを考えると、内服よりは点眼であることが望ましい。また、この効果の機序については脈絡膜循環の増加による有害物質の除去によるものか、直接的な視細胞に対する保護効果であるのかは不明である。今後、網膜視細胞を保護する医薬品の開発にとって、当研究が何ら化の示唆を与えてくれるものであれば幸いである。

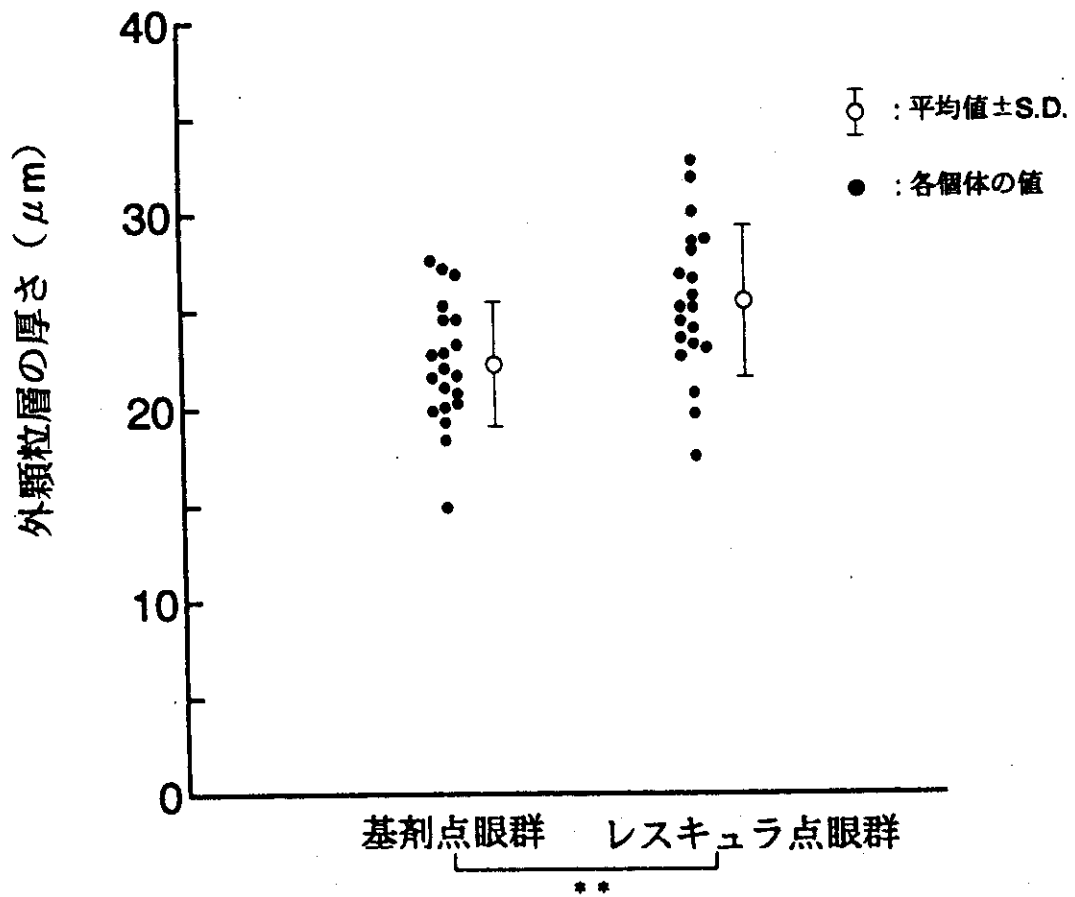


図1.レスキュラ点眼液のラット光照射網膜変性に及ぼす影響

網脈絡膜萎縮症の分子病態の解明

Study on molecular pathology of chorioretinal degeneration

大黒 浩、前田亜希子、前田忠郎、小川佳一、丸山幾代（札幌医大眼科）

Hiroshi Ohguro, Akiko Maeda, Tadao Maeda, Kei-ichi Ogawa, and Ikuyo Maruyama
Department of Ophthalmology, Sapporo Medical University School of Medicine

要約

網膜脈絡膜変性症のうち、後天的に悪性腫瘍に随伴し、自己免疫機序で網膜色素変性と類似の網脈絡膜変性を来す悪性腫瘍随伴網膜症は、肺癌などに随伴するCAR(Cancer-associated retinopathy)と悪性黒色腫に随伴するMAR (Melanoma-associated retinopathy)に2分される。これらの分子病態を明らかにするために検討を行ったところCARではリカバリンの他に熱ショック蛋白質であるheat shock cognate protein 70に対して血清自己抗体を持つことが判明した。一方MARでは免疫染色を用いた新しいassay法により自己抗原の精製を行った。従ってこれらの自己抗原が本症の病態に深く係わることが示された。

Among chorioretinal dystrophies cancer-associated retinopathy (CAR), which is characterized by retinitis-pigmentosa-like retinal degeneration, is classified into CAR associated with lung cancer and other cancers, and melanoma-associated retinopathy (MAR) associated with cutaneous malignant melanoma. In order to elucidate molecular pathology of these diseases, we identified retinal autoantigens. In CAR, both recoverin and heat shock cognate protein 70 are found, and MAR antigen was purified using immunocytochemistry assay. These observations suggest that these antigens play significant roles in the pathophysiology of these diseases.

キーワード 網膜色素変性、癌関連網膜症、リカバリン、熱ショック蛋白質、自己免疫
retinitis pigmentosa, cancer-associated retinopathy, recoverin, heat shock protein, autoimmunity

はじめに

網脈絡膜、視神経萎縮症である1)網膜色素変性、2)ぶどう膜炎および視神経炎などの一部の発症には、それぞれ網膜視細胞に特異で視興奮関連蛋白質であるロドプシンのmutationおよびアレステチンによる自己免疫などの関与が明らかになってきた1)。しかしその詳細な分子機構について明らかでない。我々の研究グループは現在までに網膜特に視細胞での光情報伝達機構を中心に関連蛋白質の研究を行ってきた2-14)経過をふまえて、網脈絡膜、視神経萎縮症の発症の分子機構を蛋白質レベルで明らかにすることを目的として研究を開始した。1) 昨年、平成8年度より厚生省の難病指定を受けている網膜色素変性で常染色体性優性型のうち本邦で最も頻度の多く認められるロドプシンmutation(特にC末端近傍)とロドプシン機能(磷酸化)との関係解明を明らかとした15)。また昨年は、後天的に悪性腫瘍に随伴し、自己免疫機序で網膜色素変性と類似の網脈絡膜変性を来す悪性腫瘍随伴網膜症16, 17)のうち肺癌などに随伴するCAR(Cancer-associated retinopathy)と悪性黒色腫に随伴するMAR (Melanoma-associated retinopathy)について検

討したところそれぞれウエスタンブロットと免疫染色をもちいて、従来の報告同様、患者血清中に網膜抗原に対する自己抗体の存在を明らかとした。しかしそれら自己抗原の同定や網膜症を引き起こす機序についての検討はなされていない。

そこで今回CARおよびMARの分子病態を解明するために両網膜症を引き起こす自己抗原の分離精製および同定を行った。この知見は、もう一方の網脈絡膜変性疾患である網膜色素変性の病態の理解にも役立つものである。

方法

- 1) 本邦における悪性腫瘍随伴網膜症患者に認められる自己抗体の特徴
 - 1-1) 本邦のCAR患者血清中に存在する抗網膜抗体の認識する抗原をwestern blot法により検討する。方法; 牛網膜可溶性および膜画分をSDS電気泳動したものをPDGF膜に転写し、スキนมilkでblockingをした後に患者血清およびHRP標識抗ヒトIgGをそれぞれ1次および2次抗体として用いたwestern blotを行う。
 - 1-2) 牛網膜を用いて自己抗原の精製し、蛋白質

化学的手法により蛋白質の一次構造を明らかとする。方法；CAR抗原を牛網膜可溶性画分からDEAE cellulose columnを用いて部分精製し、western blot法で2次元電気泳動ゲル上に抗原蛋白質を同定する。その後抗原蛋白質のバンドを切り取り、Lys C proteaseを用いたin gel digestionを行い、消化ペプチドをHPLC逆送カラムで精製した。

2) MAR抗原の同定

2-1) 免疫染色を用いたMAR抗原検出assay法の確立方法；MAR患者血清を用いた免疫染色により非常に再現性よく網膜双極細胞層が標識されることを利用して、網膜画分とMAR患者血清をpreincubationした後に免疫染色し、抑制がかかるかどうかでMAR抗原のありなしを判定した。免疫組織化学は、ラット網膜氷薄切片を用い、反応混液(サンプル 100ml、10倍濃縮PBS 10ml、MAR患者IgG 10ml)を40Cで一晩インキュベートしたものを一次抗体およびCy3蛍光色素標識抗ヒトIgG(400倍)を2次抗体として用いおこなった。観察はgreen励起光にて行った。

2-2) MAR抗原の精製

方法；牛網膜を1)可溶性および膜画分、2)サッカロース密度勾配遠心法により視細胞外節画分(ROS)とそれ以外にの膜に分離し、各画分のassayを行いどの画分にMAR抗原が存在するかを調べることにより精製を進める。

結果および考察

1) 本邦における悪性腫瘍随伴網膜症患者に認められる自己抗体の特徴

本邦におけるCAR4症例の網膜可溶抗原に対するウェスタンブロットの結果を図1に示す(lane1;抗リカバリン抗体、lane 2;肺小細胞癌、lanes 3;肺腺癌、lane4;胃ガン、lane5;肺小細胞癌)。各症例でバンドの濃さに差は認められるもののすべての症例で分子量26kDaと65kDaの共通の成分が認められ、分子量26kDaのバンドは牛網膜より精製したリカバリンを免疫して作成した抗体の認識するバンド一致したためにこれがリカバリンであることが示された。したがって欧米では、分子量26kDa(リカバリン)が主なCAR抗原と考えられているが、本邦におけるCARの発症にはリカバリンに加え65kDaの両者が関与することが示唆された。

2) 新しい65kDaCAR抗原蛋白質の同定

牛網膜を用いて65kDaCAR抗原蛋白質を精製し、その一次構造を明らかとするために、牛網膜可溶性画分を遠心分離後DEAE cellulose columnを用いて

部分精製した。western blot法で65kDaCAR抗原蛋白質を含む画分を集め濃縮乾燥後、2次元電気泳動で検討した。抗原蛋白質が2次元電気泳動ゲル上のどのバンドかをwestern blot法で決定し、そのバンドを切り取り、Lys C proteaseを用いたin gel digestionを行い、消化ペプチドをHPLC逆送カラムで精製した(図2)。それらペプチドの一次構造(図3)をアミノ酸自動配列分析器で検討したところ、これがheat shock cognate protein 70であることが判明した。

2) MAR抗原の精製

MAR抗原をCAR抗原同様にwestern blot法により検討を行ったところ、MAR抗原は非常に微量な膜蛋白であるらしくwestern blot法でMAR抗原検出はできなかった。そこでMAR抗原検出assay法の確立するために、MAR患者血清を用いた免疫染色により非常に再現性よく網膜双極細胞層が標識されることを利用して、網膜画分とMAR患者血清をpreincubationした後に免疫染色し、抑制がかかるかどうかでMAR抗原のありなしを判定する方法を用いた。このassay法をもちいてMAR抗原牛網膜から精製を開始した。まず牛網膜を可溶性および膜画分に大別したところ、膜画分のみ免疫染色抑制能を認めた。さらに精製を進めるためにサッカロース密度勾配遠心法により視細胞外節画分(ROS)とそれ以外にの膜に分離したところ、ROS以外の神経細胞由来の膜画分(RNM, retinal neuronal membrane)に抗原が存在することが明らかとなった(図4)。この手法を用いてさらなる精製を進めるたところ、図5に示すようにRNMをサッカロース密度勾配遠心法により形質膜部分を精製し、detergentにて可溶化後、患者血清を結合させたaffinityカラムにより精製を行った。

文献

- 1、大黒浩、秋野豊明：視細胞における情報伝達機構。眼科New Insight 1 若倉雅登編；10-20, 1992.
- 2、Ohguro H, Fukada Y, Akino T: Function and structure of r-subunit of photoreceptor G-protein. A mini review. Comp Biochem Physiol ; 100B: 422-428,1991.
- 3、Fukada, Y, Takao, T, Ohguro, H, et al.: Farnesylated Y-subunit of photoreceptor G-protein is indispensable for GTP-binding. Nature ; 364: 658-660,1990.
- 4、Ohguro, H, Fukada, Y, Takao, T, et al.: Carboxyl methylation and farnesylation of transducin Y-subunit synergistically enhance

- its coupling with metarhodopsin II. *EMBO J* ; 10: 3669-3674, 1991.
- 5、大黒浩、深田吉孝、相馬仁、他：光感受性に脱リン酸化される視細胞外節に存在するリン酸化蛋白質。 *日本眼科学会雑誌* ; 97: 11-16, 1993.
- 6、Robinson, P.R., Buczylo, J., Ohguro, H., et al.: Opsins with mutations at the sites of chromophore attachment constitutively active transducin but are not phosphorylated by rhodopsin kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 91: 5411-5415, 1994.
- 7、Ohguro, H, Palczewski, K, Walsh, KA, et al.: Topographic study of arrestin using differential chemical modifications and hydrogen/deuterium exchange. *ProtSci* ; 3: 2428-2434, 1994.
- 8、Ohguro H, Palczewski K: Separation of phospho- and non-phosphopeptides using reverse phase column chromatography. *FEBS Lett* ; 368: 425-454, 1995.
- 9、Ohguro H, Kitamura K, Konari K, et al.: The difference in the expressions of visual pigments and transducin in photoreceptor cell differentiation. *Tohoku J Exp Med* 1996; 178: 233-240.
- 10、Ohguro, H, Palczewski, K, Ericsson, LH, et al.: Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. *Biochemistry* ; 32: 5718-5724, 1993.
- 11、Ohguro, H, Johnson, RS, Ericsson, LH, et al.: Control of rhodopsin multiple phosphorylation. *Biochemistry* ; 33: 1023-1028, 1994.
- 12、Ohguro, H, Van Hooser, JP, Milam, AH, et al.: Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo. *J Biol Chem* ; 270: 14259-14262, 1995.
- 13、Zhao X, Palczewski K, Ohguro H: Mechanism of rhodopsin phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* ; 56: 183-188, 1995.
- 14、大黒浩：ロドプシンのリン酸化脱リン酸化の生理的意義と疾病との関係。 *日本眼科学会雑誌* ; 100: 575-581, 1996.
- 15、High levels of phosphorylation in missense mutations of C-terminal region of rhodopsin. *FEBS Lett* 413: 433-435
- 16、Jackson DM, Thirkill CE, Tipping SJ: A clinical triad to diagnose paraneoplastic retinopathy. *Ann Neurol* ; 28: 162-167, 1991.
- 17、Milam AH, Saari JC, Jacobson SG et al.: Autoantibodies against retinal bipolar cells in cutaneous melanoma-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* ; 34: 91-100, 1993.

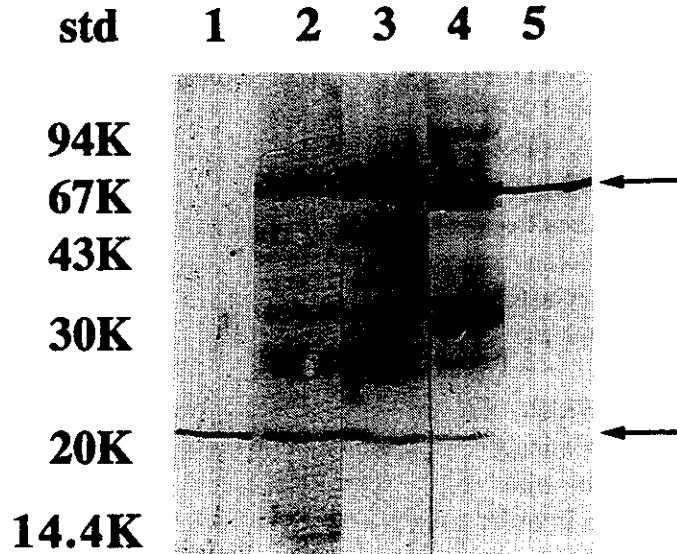


図1 本邦CAR4症例の網膜可溶抗原に対するウエスタンブロット
 lane1; 抗リカバリン抗体、lane 2; 肺小細胞癌、lanes 3; 肺腺癌、
 lane4; 胃ガン、lane5; 肺小細胞癌。抗体の希釈は抗リカバリン抗体
 および患者血清がそれぞれ3000倍および500倍。

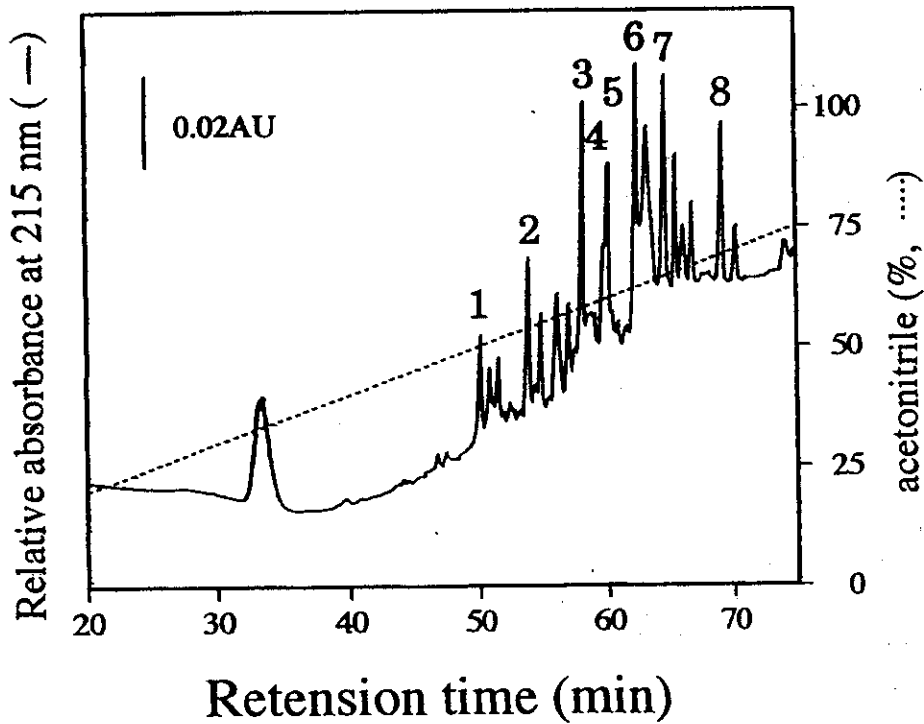


図2 65kDa蛋白質のin gel digestionで得られた消化ペプチドの分離
 精製65kDa蛋白質をLys C proteaseを用いたin gel digestionを
 行い、消化ペプチドをHPLC逆送カラム(C18)で精製した。

1 MSKGPVAVGID LGTTYSCVGV FQHGKVEIIA NDQGNRTTPS YVAFTDTERL IGDAAKNOVA
 P8
 61 MHEENTVEDA KRLIGRRFDD AVVQSDMKHW FEMVVNDAGR PKVQVEYKGE TESFYPEEVS
 121 SNVLTKKEI AEAYLGKTVT NAVVTVPAYF NDSQRQATKD AGTIAGLNYL RLINPTAAA
 P6
 181 IAYGLDKKVG AERNVLIFDL CGGTFOVSIL TIEDGIFEVK ETAGDTHLGL EDDEKRVNH
 P2
 241 FIAEFKAKHK KOISENKRAV RRLRTACERA KRTLSSSTQA SIEIDSLYEG IOFTYSITRA
 301 RFEELNADLF RGTLDPEVKA LRDAKDKSQ IMDIVLVGGS SRIPKIQKLL QDFTNGKILN
 P4
 361 KEMDEAVA YGAAYDAAIL SGDKSENVQD LLLLOVTFLS LGIETAGCVK TVLIKRMTHI
 P5
 421 PTNQTQITFT YSDNQPGVLI QVYEGERANT KDWLLGKFE LIGIPPAPRG VPQIEVTFDI
 481 DANGILNVSA YDKKXKENE ITITNKGRL SKEDIERNVQ EAERYKAZDE KQDKVSSFN
 P6
 541 SLKSYAFNKK ATVEDEKLGQ KINDEKQKI LDKCNEIINW LDKNQTAERE EFESQOKLE
 601 KYCNELITKL XQSAGGKPGG MFGGMPCGFP GCGAPPSOGA SSGPTIEEVD
 P3

図3 heat shock cognate protein 70の一次構造 1-8は6.5 kDa蛋白質のin gel digestionで得られた消化ペプチドのアミノ酸配列を示す。

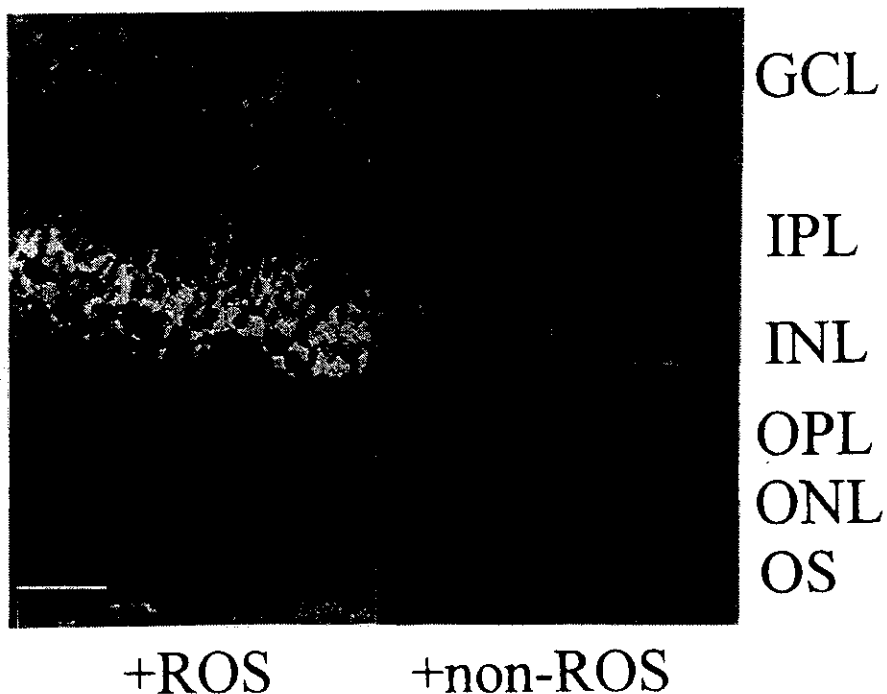


図4 免疫染色を用いたMAR抗原の同定免疫染色を用いたMAR抗原assay法により視細胞外節画分 (ROS) とROS以外の神経細胞由来の膜画分 (RNM, retinal neuronal membrane) を調べたところRNMに抗原が存在することが明らかとなった。

purification of MAR antigen

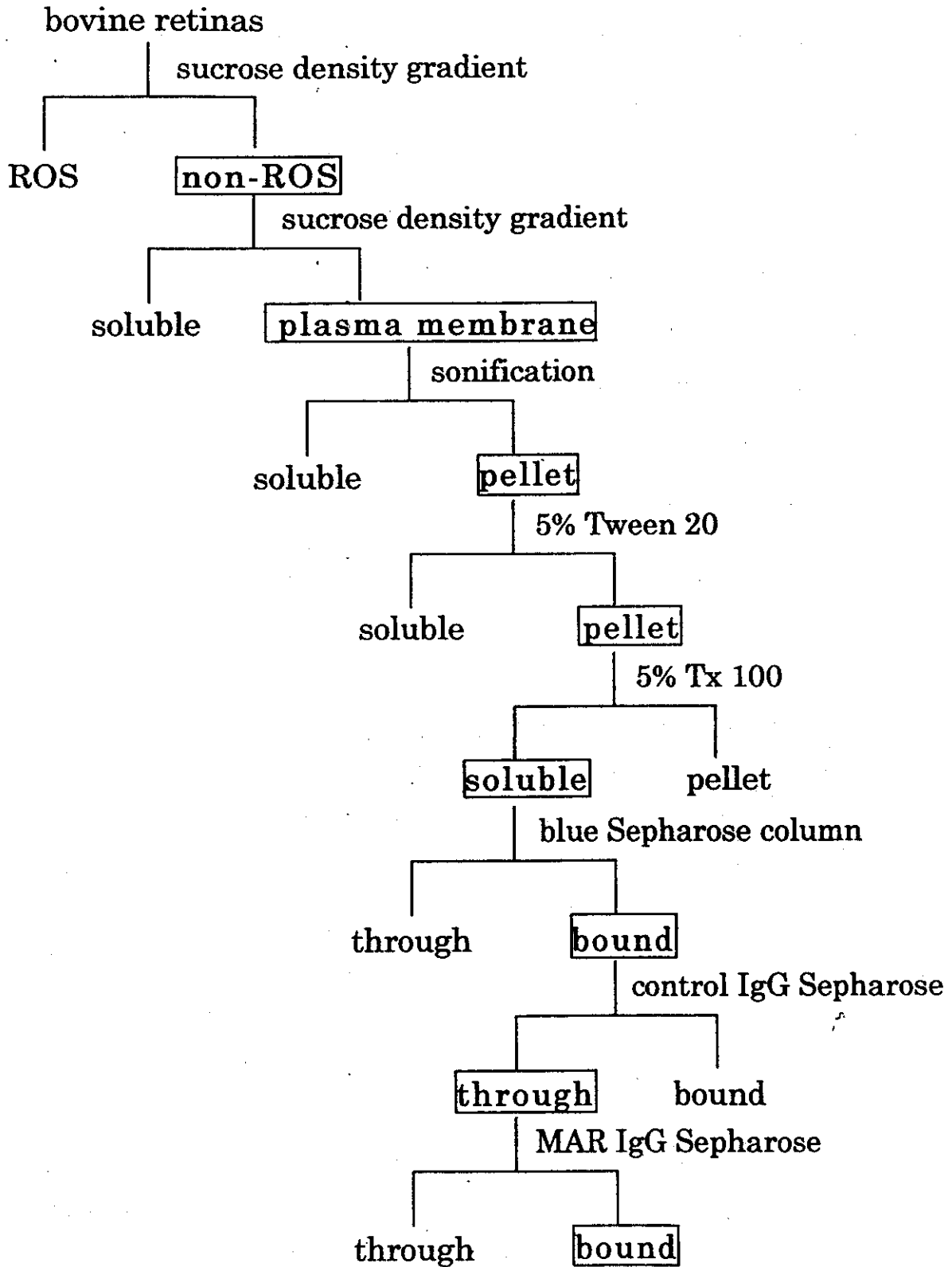


図5 MAR抗原の精製法

19980849

報告書 P. 83-87は下記に掲載

Characterization of multi-input electroretinogram using normal control subjects (Clinical Investigation)

Hiroshi Ohguro, Maki Saito, Kei-ichi Ogawa, Takashi Nakagawa

Graefe's Archive for Clinical & Experimental Ophthalmology. Volume 236
Number 11, pp.829-833, 1998

19980849

報告書 P. 88-92は下記に掲載

Identification of a Single Phosphorylation Site Within Octopus Rhodopsin
Hiroshi Ohguro, Norihiko Yoshida, Hideo Shindou, John W. Crabb,
Krzysztof Palczewski and Motoyuki Tsuda
Photochemistry and Photobiology. Volume 68 Number 6, pp.824-828,
1998

19980849

報告書 P. 93-100は下記に掲載

**Recoverin and Hsc 70 Are Found as Autoantigens in Patients with
Cancer-Associated Retinopathy**

Hiroshi Ohguro, Kei-ichi Ogawa, and Takashi Nakagawa

Investigative Ophthalmology & Visual Science. Volume 40 Number 1,
pp.82-89, 1999

アレスチン遺伝子異常をともなう網膜変性について

Retinal degenerations associated with mutation in the arrestin gene

中沢 満 (弘前大学医学部眼科)

Mitsuru Nakazawa Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine
共同研究者: 和田裕子 (東北大学医学部眼科)

Yuko Wada Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine
玉井 信 (東北大学医学部眼科)

Makoto Tamai Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine
川崎 良 (山形大学医学部眼科)

Ryou Kawasaki Department of Ophthalmology, Yamagata University School of Medicine
山口克宏 (山形大学医学部眼科)

Katsuhiro Yamaguchi Department of Ophthalmology, Yamagata University School of Medicine

抄録

アレスチン遺伝子異常1147delAは、日本人小口病に高頻度に認められることが知られている。我々は、1147delAを持つ小口病患者の同胞例で網膜色素変性を持つ症例にやはりアレスチン遺伝子1147delA変異を検出して以来、アレスチン遺伝子異常が小口病のみならず網膜色素変性の原因にもなりうるのではないかと考えて検索を続けた結果、さらに定型的な網膜色素変性1症例と中心型網膜色素変性に周辺部に小口病様の金箔様眼底反射をもつ2症例の計4症例に同様のアレスチン遺伝子1147delA変異を認めた。この結果、アレスチン遺伝子異常は日本人の小口病、網膜色素変性に金箔様反射をもつ眼底、そして網膜色素変性という一連の臨床的スペクトラムに関係していることが示唆された。

Mutation in the arrestin gene has been known to be frequently recognized among Japanese patients with Oguchi disease. We recently identified a patient with retinitis pigmentosa who was a sibling of a patient with Oguchi disease associated with arrestin 1147delA mutation. Also, this patient had the same 1147delA mutation. Therefore, we speculated that mutations in the arrestin gene might cause not only Oguchi disease but also retinitis pigmentosa and initiated further analysis. As a result of it, we further identified a patient with retinitis pigmentosa without golden-yellow fundus reflex and two patients with central retinitis pigmentosa associated with golden-yellow fundus reflex in the peripheral portion. These 3 patients also had the same 1147delA mutation in the arrestin gene. Results suggest that mutations in the arrestin gene are related to a spectrum of phenotypes including Oguchi disease, retinitis pigmentosa with golden-yellow fundus reflex, and retinitis pigmentosa.

キーワードアレスチン、網膜変性、網膜色素変性、小口病、金箔様眼底反射
arrestin, retinal degeneration, retinitis pigmentosa, Oguchi disease, golden-yellow fundus reflex

緒言

アレスチン遺伝子異常1147delA 変異は、日本人小口病の主要な遺伝子異常として知られている。¹⁾²⁾ また、これまでの厚生省班会議において我々は1147delA変異をもつ小口病の同胞例(症例1)が網膜色素変性であり同じアレスチン遺伝子異常1147delA 変異が認められること、さらに中心型網膜色素変性に小口病眼底を合併した症例(症例2)でもアレスチン遺伝子異常1147delA 変異が認められたことを報告し、アレスチン遺伝子異常が単に小口病とい

う停止性夜盲疾患の原因となるばかりでなく進行性疾患の代表である常染色体劣性網膜色素変性にも関与するのではないかと考察した。³⁾ 昨年はその推論を検証するため常染色体劣性網膜色素変性患者120症例のアレスチン遺伝子のスクリーニングを行い、1例の定型的網膜色素変性症例(症例3)にもやはり同様なアレスチン遺伝子異常1147delA 変異を検出した。⁴⁾ さらに本年度は症例2に類似した中心型網膜色素変性に金箔様眼底反射を合併した55歳男性症例(症例4)についてその遺伝子異常と臨床像を検索し

た。

方法

症例4の末梢血よりゲノムDNAを調整しPCR-SSCP法によるアレスチン遺伝子exon11の突然変異スクリーニングと塩基配列の決定を行った。また、ほかの遺伝子の異常も関与しているか否かを確認するためにperipherin/RDS, ROM1, rhodopsin遺伝子の突然変異スクリーニングをおこなった。さらに臨床像の検討として視力、眼圧測定、細隙灯顕微鏡検査、眼底検査、蛍光眼底検査、網膜電図、暗順応の各検査を行った。

結果

症例4のゲノムDNAにアレスチン遺伝子異常1147delA変異をホモ接合で認めた。peripherin/RDS, ROM1, rhodopsinの各遺伝子には異常は認められなかった。臨床所見としては矯正視力右左とも0.1、眼圧右左とも14mmHg、水晶体周辺部に混濁を認める以外に前眼部、中間透光体に異常は認められなかった。眼底所見は血管アーケードと視神経乳頭により囲まれた領域に比較的境界鮮明でかつ色素沈着をともなった網脈絡膜変性像を認めた。また周辺部には金箔様眼底反射を認めた。網膜電図ではa波とb波の著明な振幅低下を認めた。暗順応検査では120分の順応時間で1次暗順応のみ認められ2次暗順応曲線は得られなかった。なお、この症例は幼少時より夜盲と色覚異常を指摘されており、家族歴では母親に色覚異常があったほかは特記すべきものはなかった。

結論

今回の検索と前回までの研究を総合すると小口病同胞例を含む網膜色素変性4例にアレスチン遺伝子異常1147delA変異が認められた。臨床像の特徴は定型的網膜色素変性2例と中心型網膜色素変性に周辺部に金箔様眼底反射をともなった症例2例であった。検索できる範囲では、変異と臨床像の間に関連性が認められ、健常者にはこの変異は認められなかった。以上のことよりアレスチン遺伝子は停止性夜盲性疾患の小口病のみならず進行性疾患である網膜色素変性の原因にもなりうるということが推定され、その臨床像としては小口病、網膜色素変性に金箔様反射をともなう眼底および網膜色素変性というスペクトラムになることが示唆された。⁹⁾

文献

1. 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.

Nature Genet. 10, 360-362 (1995).

2. Nakazawa, M., Wada, Y., Fuchs, S., Gal, A. & Tamai, M. Oguchi disease: Phenotypic characteristics in patients associated with the frequent 1147delA mutation in the arrestin gene. Retina 17, 17-22 (1997).

3. 中沢満、和田裕子. 遺伝性網膜変性症の遺伝子異常と臨床像の関連. 厚生省特定疾患 網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班 平成9年度研究報告書, 18-20 (1997).

4. 和田裕子、中沢満、玉井信. 常染色体劣性網膜色素変性におけるアレスチン遺伝子異常. 厚生省特定疾患 網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班 平成10年度研究報告書, 81-82 (1998).

5. Nakazawa, M., Wada, Y., Tamai, M. Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. Arch. Ophthalmol. 116, 498-501 (1998).

19980849

報告書 P. 103－106は下記に掲載

Arrestin Gene Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa

Mitsuru Nakazawa, Yuko Wada, Makoto Tamai

Archives of Ophthalmology. Volume 116, pp.498-501, 1999

日本人X染色体劣性網膜色素変性症における RP2遺伝子異常および臨床像の検索

東北大学眼科 和田裕子、阿部俊明、玉井 信
弘前大学眼科 中沢 満

現在までに、日本人X染色体劣性網膜色素変性の遺伝子異常の報告はない。我々は、RP2遺伝子異常が日本人X染色体劣性網膜色素変性 (XLRP)の原因になりうるか否か、またその臨床像の特徴を探ることを目的とした。東北大学眼科で経過観察している、XLRP15家系34名中に対して、PCR-SSCP法によるスクリーニングの結果、1家系にLeu253Arg変異が認められた。臨床像は、進行した網膜色素変性が認められ、保因者の母親は眼底に軽度の網膜色素上皮が認められた。私たちの検索により、RP2遺伝子異常は日本人X染色体劣性網膜色素変性の原因になることが判明した。

Objective: To identify the clinical findings in a Japanese family with X-linked retinitis pigmentosa associated with mutation in codon253 (Leu253Arg) in the RP2 gene. Patients: One affected hemizygot with retinitis pigmentosa associated with transversion mutations in codon 253 (Leu253Arg) of the RP2 gene and the obligate carrier was examined. Results: A novel Leu253Arg mutation of the RP2 gene was found to cosegregate with retinal degeneration in one affected male and one carrier in female heterozygote in a Japanese family. The ophthalmic findings in hemizygot showed severe retinal degeneration. In the obligate carrier, mild chorioretinal degeneration was observed in both eyes. Discussion: The mutation at codon 253 of the RP2 gene is the first mutation reported in a Japanese family. We conclude that the mutation of the RP2 gene also causes the X-linked retinitis pigmentosa in Japanese patients.

キーワード : X染色体劣性網膜色素変性、RP2遺伝子
Key word : X-linked retinitis pigmentosa, RP2, Leu253Arg

目的

網膜色素変性症の遺伝形式は、常染色体優性遺伝、常染色体劣性遺伝およびX染色体劣性遺伝の3種類がある。X染色体劣性網膜色素変性症は、そのうち2%から6%を占め3種類の遺伝形式の中では、最もまれであり、臨床所見も30代から40代で失明に至ることが多いといわれている。1996年にRPGR遺伝子がX染色体劣性網膜色素変性症の原因遺伝子であることが報告された。また1998年にRP2遺伝子が新たに、X染色体劣性網膜色素変性症の原因遺伝子であることが判明した。そこで我々は、RP2遺伝子が日本人X染色体劣性網膜色素変性症の原因遺伝子であるか否か、およびその頻度を探ることを目的とした。

方法

東北大学眼科で経過観察しているX染色体劣性網膜色素変性症15家系34名に対してRP2遺伝子exon1からexon5までの全てのexonに対してPCR-SSCP法によるスクリーニングを行い、異常が認められたバンドをdirect sequence法で塩基配列の決定を行っ

た。

結果

15家系34名中1名にexon2に異常なバンドがSSCPで認められた。塩基配列の決定を行った結果、患者はLeu253Argの変異が認められ、保因者の母親はヘテロ接合体でLeu253Argの変異を持っていた。患者は29才、男性。視力は右眼、手動弁、左眼(0.01)で眼底は黄斑部を含む眼底全体に高度の網膜変性が認められた。

考察

1996年にRPGR遺伝子、1988年にRP2遺伝子がX染色体劣性網膜色素変性症の原因遺伝子であることが報告されたが、現在までに日本人X染色体劣性網膜色素変性症の遺伝子異常は報告がない。特にRP2遺伝子に関してはUwe Schwahnらが報告した6つのみでありそのうちのmissense mutationは1つのみである。今回我々が発見した遺伝子異常は現在まで報告がなく、また日本人X染色体劣性網膜色素変性症の初めての遺伝子異常でありかつRP2遺伝子異

常をもつ患者の臨床像を詳細に報告した最初の例である。Uwe Schwahnらの報告ではX染色体劣性網膜色素変性症の18%にRP 2 遺伝子異常が確認できる報告しているが、日本人X染色体劣性網膜色素変性症では私たちが検索した範囲ではその頻度はかなり低いと考えられた。

1) Fishman, G.A., Farber, M.D., Derlacki, D.J. X-linked retinitis pigmentosa: profile of clinical findings. Arch. Ophthalmol. 1988; 106: 369-375.

2) Bhattacharya SS, Wright AF, Clayton JF, et al. Close genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and restriction fragment length polymorphism identified by recombinant DNA probe L1. Nature. 1984; 309: 253-255.

3) Musarella MA, Burghes A, Anson-Cartwright L, et al. Localization of the gene for X-linked recessive type of retinitis pigmentosa (XLRP) to Xp21 by linkage analysis. Am J Hum Genet. 1988; 43: 263-266.

4) Meindl, A, et al. A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). Nature Genetics. 1996; 13: 36-42

5) Uwe, S., Steffen, L, et al. Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. Nature Genetics. 1998; 19: 327-332.

6) Nakazawa M, Kikawa E, Chida Y, et al. Nonradioactive single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): a simplified method applied to molecular genetic screening of retinitis pigmentosa. In: Hollyfield ZJG, LaVail MM, Anderson RE, eds. retinal degeneration: Clinical and Laboratory Applications. New York, NY: Plenum Corp; 1993: 181-188.

7) Nakazawa M, Kikawa-Araki E, Shiono T, Tamai M. Analysis of rhodopsin gene in patients with retinitis pigmentosa using allele-specific chain reaction. Jpn J Ophthalmol. 1991; 35: 386-393

8) Fishman GA, Grover, S., Buraczynka, M, et al. A new-base pair deletion in the RPGR gene in a black family with X-linked retinitis pigmentosa. Arch Ophthalmol. 1998; 116: 213-218.

9) Andreasson S, Ponjavic V, Abrahamson M, et al. Phenotypes in three Swedish families with X-linked retinitis pigmentosa caused by different mutations in the RPGR gene. Am J Ophthalmol. 1997; 124: 95-102.

10) Fujita R, Byraczynska M, Gieser L, et al. Analysis of the RPGR gene in 11 pedigrees with the retinitis pigmentosa type 3 genotype: paucity of mutations in the coding region but splice defects in two families. Am J Hum Genet. 1997; 61: 571-580.

11) Wada Y, Nakazawa M, Abe T, Tamai M. A New Leu253Arg Mutation in the RP2 Gene in a Japanese Family with X-linked Retinitis Pigmentosa. Submitted

