

Fig.4

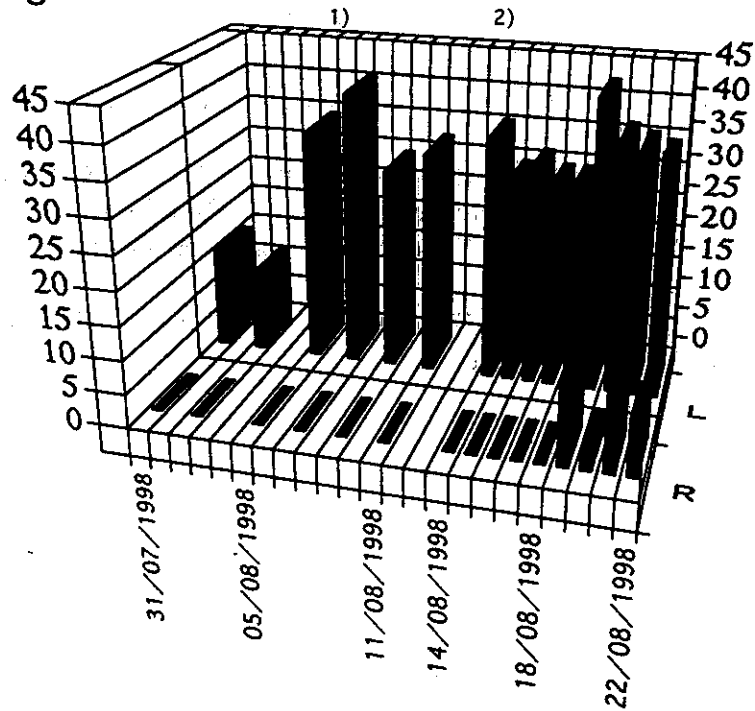


Fig. 4. The effect of cataract extraction and lipoprostaglandin E1 to another patient. Before surgery, the patient could not answer correctly to any intensity of stimulation given to the right eye. In the left eye, he could answer 10 to 15 stimuli out of 45 trial s. After surgery to the left eye, on August 4th shown 1) in the figure, his level had dramatically improved. On August 13th, the treatment of lipoprostaglandin E1 was started as marked 2) in the figure. The left eye did not show as much improvement, but his right eye could respond to light stimuli with 1000C in the second half period.

萎縮型加齢黄斑変性におけるABCR遺伝子の解析

Molecular Genetic Analysis of ABCR Gene in Japanese
Dry-type Age-related Macular Degeneration

布施 昇男、鈴木 健史、和田 裕子、吉田 まどか、阿部 俊明、玉井 信（東北大）、
中沢 満（弘前大）

Nobuo Fuse,* Takefumi Suzuki,* Yuko Wada,* Madoka Yoshida,*
Toshiaki Abe,* Mitsuru Nakazawa, and Makoto Tamai**
Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine,
Sendai, Miyagi 980-8574, Japan,
Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine,
Hirosaki, Aomori 036-8562, Japan

要約

日本人の萎縮型加齢黄斑変性においてretina-specific ATP binding cassette transporter (ABCR)遺伝子に遺伝子異常があるかを検索した。東北大学で診断された萎縮型加齢黄斑変性25例において、26個のexonをpolymerase chain reaction (PCR)法で増幅し、Direct sequence法にて塩基配列を決定した。その結果5つの塩基置換が認められた。4つのアミノ酸配列を変化させるようなmutationが存在したが、そのうち3つは25例と正常の対照群すべてに認められた。もう1つは、対照群の方が頻度の高いものであった。また、Stargardt病で発表されているpormorphismと同じ塩基置換も存在した。今回の検討からは、ABCR遺伝子変異と日本人の萎縮型加齢黄斑変性には関連性はないと考えられた。

Twenty-five Japanese people with nonfamilial dry-type age-related macular degeneration (dry AMD) were studied to detect retina-specific ATP binding cassette transporter (ABCR) gene defects. Twenty-six exons of the ABCR gene were amplified by a polymerase chain reaction and were then directly sequenced. Five point mutations were detected. Four alteration were missense mutation in conserved amino acid positions. But three alterations were found in all cases and controls. One missense mutation was in excess among the controls. One alteration was pormorphism, the same as that of Stargardt disease. This study suggests that allelic variation in ABCR is not associated with Japanese dry AMD.

Key Words: retina-specific ATP binding cassette transporter (ABCR), dry-type age-related macular degeneration (dry AMD), Stargardt disease, allelic variation, missense mutation, pormorphism

目的

加齢黄斑変性は日本においても近年ますます増加している、高度の視力障害をきたす疾患である。その背景には環境的な危険因子¹とともに、遺伝的な要素も関係している^{2,3}と考えられてきた。加齢黄斑変性に似た遺伝性の網膜変性疾患はいくつか存在しているが、加齢黄斑変性における遺伝子異常は今まで報告されていない。例えば、Sorsby fundus dystrophyはtissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3)の遺伝子異常が原因である⁴が、TIMP-3の遺伝子異常は加齢黄斑変性においては見つかっていない。最近Allikmetsらは加齢黄斑変性において、Stargardt病の原因遺伝子

であるABCR (Retina-specific ATP binding cassette transporter)⁵に13の遺伝子異常があることを報告した⁶。しかし、その後追試が行われABCR遺伝子異常と加齢黄斑変性との関連性を積極的に支持するような報告はなされず、StoneらはABCR遺伝子異常はStargardt病に関係するが加齢黄斑変性には関係しないと報告している⁷。我々は、Allikmetsらが報告した遺伝子異常を持つ26例の加齢黄斑変性の中で25例は萎縮型加齢黄斑変性であり、滲出型加齢黄斑変性は1例であることに着目した。そこで、日本人の萎縮型加齢黄斑変性とABCR遺伝子の異常に関連性があるか検討することを目的とした。

対象と方法

東北大学眼科外来でSLOを用いたFA, IA検査を行い、萎縮型加齢黄斑変性と診断された25例の患者からinformed consentに基づいて末梢血を採取した。対照群は加齢黄斑変性を認めない40例の患者とした。末梢血からgenome DNAを抽出し、目的の26個のexonをPCR法で増幅した。選んだexonは、Allikmetsらが発表した加齢黄斑変性に関係した変異を含むexonと、彼等がStargardt病におけるスクリーニングを行ったexonである (Fig.1)。得られたPCR産物をすべてdirect sequence法にて塩基配列を決定し解析した。SequencerはPerkin-Elmer Applied Biosystems社のABI PRISM™ 310 Genetic Analyzerを用いた。

結果

今回調べた26個のexonの検討の結果を表に示す (Fig.2)。Exon23に全例でP1116S, H1125L, Q1126Lの塩基置換が認められたが、これは対照群においても全例認められた。Exon29にAllikmetsらが発表した変異と同じT1428Mのアミノ酸変異が1例認められた (1/25; 4%) が、この変異は対照群にも認められた (2/40; 5%)。Stargardt病における既知のポリモルフィズムと同じI2083Iが2例認められた。intron33にヘテロの塩基置換が4例、ホモの塩基置換が2例認められた。

考案

Exon23に全例でP1116S, H1125L, Q1126Lの塩基置換が認められたことは、人種差によるものかもしくはsequence errorと考えられた。Azarianらが報告したsequence8と我々のsequenceが一致することから後者の可能性が高いと考えられた。Allikmetsらは加齢黄斑変性の16%にABCR遺伝子の異常があると報告したが、今回の検討ではこれを支持する結果は得られなかった。彼等が、ABCR mRNAは桿体細胞に発現していると報告しており、ABCRの機能及びABCR遺伝子の発現調節機構の解明も必要であると思われる。今回の検討では、萎縮型加齢黄斑変性とABCR遺伝子異常との関連性はないと考えられた。

文献

1. Seddon JM, Willett WC, Speizer FE, Hankinson SE. A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women. *J. Am. Med. Assoc.* 1996; 276:1141-1146.
2. Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD. Familial aggregation of age-related

maculopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 1997; 123:199-206.

3. Heiba IM, Elston RC, Klein BEK, Klein R. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Genet. Epidemiol.* 1994; 11:51-67.
4. Weber BHF, Vogt G, Pruett RC, Stohr H, Felbor U. Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nature Genet.* 1994; 8:352-356.
5. Allikmets R, Singh N, Sun H, et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nature Genet.* 1997; 15:236-245.
6. Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, et al. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science.* 1997; 277:1805-1807.
7. Stone EM, Webster AR, Vandeburgh K, et al. Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nature Genet.* 1998; 20:328-329.
8. Azarian SM, Travis GH. The photoreceptor rim protein is an ABC transporter encoded by the gene for recessive Stargardt's disease (ABCR). *FEBS Lett.* 1997; 409:247-252.

Table 1. Examined 26 Exons and mutations of the ABCR Gene

Exon	AMD	STGD	Exon	AMD	STGD
11	E471K		29	T1428M	
15			31	R1517S	
16		G818E, G863A (D847H)	33	I1562T, G1578R	
17			34		N1614FS
18			35		
19		V931M, 2884delC N965M, (R943Q)	36	5196+1G→A	5041del15 5196+2T→C
20			40	R1898H	R1898H
21		A1028V	42	G1961E	G1961E
22		3211insGT, V1072A E1087K	43	L1970F	6006+1G→T
23	R1129L		44		L2027F, R2038W (I2023I)
24			45		V2050L, R2077W (I2083I)
25			46		R2106C (V2094V)
27			48	6519Δ 11bp D2177N 6568Δ C	6519Δ 11bp 6709insG

Table 2. Alterations and polymorphism in the ABCR gene in dry AMD patients

Alteration	Base change	dry AMD (n = 25)	General population (n=40)
P1116S	C3346T (homo)	25 (100%)	40 (100%)
H1125L	A3374T (homo)	25 (100%)	40 (100%)
Q1126L	A3377T, A3378T (homo)	25 (100%)	40 (100%)
T1428M	C4283T (hetero)	1 (4%)	2 (5%)
Polymorphism			
I2083I	C6249T (hetero)	2 (8%)	0 (0%)
Intron basechange			
Intron 33:	4773+48C→T (hetero)	4 (16%)	
	4773+48C→T (homo)	2 (8%)	

ABCR遺伝子異常と加齢黄斑変性

ABCR genotypes and age-related macular degeneration

吉村長久、黒岩さち子、小島秀伸、菊池孝信（信州大学眼科）

Nagahisa Yoshimura, Sachiko Kuroiwa, Hidenobu Kojima, Takanobu Kikuchi
(Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine)

抄録目的

加齢黄斑変性患者にABCR遺伝子異常が高率に認められるかどうかを検討する。方法：信州大学医学部附属病院眼科黄斑外来で経過観察中の加齢黄斑変性症80例を対象とした。対照には同時期に白内障手術を主な目的として受診した患者100例を採用した。末梢血を採血し、genomic DNAを抽出した。Allikmetsらの方法に従い、彼らの報告で遺伝子の変異が認められた10個のexonについてPCR-SSCPを施行した。SSCPで異常をみとめたPCR ampliconについてその塩基配列を決定した。結果：Allikmetsらが報告した遺伝子変異のうち、exon 29にT1428M変異を加齢黄斑変性患者80例中7例（8.8%）に、対照群100例中8例（8%）に認めた。この変異の発生頻度は両群間に有意差を認めなかった（ $P = 0.86$ ）。結論：今回の検討では、Allikmetsらの主張を裏付ける結果は得られなかった。

Purpose. To determine whether mutations in ABCR affect the occurrence in age-related macular degeneration (AMD). Methods. Eighty unrelated Japanese patients with AMD diagnosed by indocyaninegreen angiography and age-matched 100 control subjects were studied. Genomic DNA was purified from the total blood and 10 exons that have been reported to contain AMD-associated mutations were amplified by PCR. The amplicons were analyzed by the SSCP method. The nucleotide sequencing of the amplicons were determined when necessary. Results. In exon 29, an aberrant pattern was found in 7 of 80 patients (8.8%) and 8 of 100 controls (8%). Sequencing of the PCR products revealed a heterozygous T1428M mutation which has been previously reported as one of the AMD-associated mutations. Statistical analysis showed that there was no significant difference in the occurrence of this mutation between our AMD patients and the control groups ($P = 0.86$). Conclusion. No data to support the association between the ABCR gene mutations and AMD of Japanese patients were obtained.

キーワード 加齢黄斑変性、ABCR、遺伝子異常、
age-related macular degeneration, ATP-binding cassette transporter retina, gene abnormalities

目的

近年、加齢黄斑変性の患者数は著しく増加している。これは、日本人の食生活の変化など環境要因の変化によるものであろうが、一方、加齢黄斑変性の発生頻度には人種差があること、加齢黄斑変性の家族内発症が古くから報告されているなど、加齢黄斑変性に遺伝的背景があることが考えられる。1997年 Allikmetsらは1)、Science誌に、加齢黄斑変性患者では対照群に比して有意にATP-binding cassette transporter retina (ABCR)とよばれるタンパクの遺伝子異常が高頻度に発生することを報告した。ABCRは、視細胞外節に特異的に発現するタンパクで、ホモ接合体の遺伝子異常がStargardt

病に関連することが知られている²⁾。しかし、この遺伝子異常と加齢黄斑変性との関連については議論がある。この問題について検討することが今回の主な目的である。

方法

信州大学医学部附属病院黄斑外来で経過観察中の加齢黄斑変性症80例（男性67例、女性13例、平均年齢67.2歳）を対象とした。全例にSLOによるFA, IA検査を施行し、70例に脈絡膜新生血管を認めた。対照には同時期に白内障手術を主な目的として受診した患者100例（男性54例、女性46例）を採用した。対照群に加齢黄斑変性を認めた

患者は含まれていない。加齢黄斑変性群、対照群ともに実験の目的を十分に説明し、了解を得た患者から末梢血を採血し、型の如く genomic DNA を抽出した。Allikmetsらの方法に従い、彼らの報告で遺伝子の変異が認められた10個のexon (exons 11, 23, 29, 32, 34, 37, 41, 43, 44 and 49) についてPCR法で増幅し、SSCP解析を施行した。SSCPで異常をみとめたPCR ampliconについては、direct sequencing法でその塩基配列を決定した。

結果

10個のexon中、3つにSSCP法で異常が検出された。Exon 29には、Allikmetsらが報告した遺伝子変異、1428番目のスレオニンからメチオニンへの missence mutation が加齢黄斑変性患者80例中7例(8.8%)に、対照群100例中8例(8%)に認められた。しかし、この変異の発生頻度は両群間に有意差を認めなかった($P = 0.86$) (表1)。また、exon 23, 28, 41にAllikmetsらの報告にはない変異が見つかったが、加齢黄斑変性群と対照群でその頻度に差はなく、全例に認められた変異もあった(表2)。

考按

今回の検討では、Allikmetsらの主張を裏付ける結果は得られなかった。しかしながら、今回の検討は、51あるABCRの全てのexonについて行ったものではなく、検討しなかったexonに変異がある可能性は否定はできない。Allikmetsらの分析は、主に萎縮型加齢黄斑変性についてのものであるのに対し、今回の検討は、80例中70例が脈絡膜新生血管を認める滲出型であったように主に滲出型をその対象としている。もちろん、滲出型と萎縮型で遺伝子の変異頻度に差がある可能性も否定はできない。しかし、一般には萎縮型と滲出型は同一の病気の程度の差を示すものと考えられており⁹⁾、とりわけこの区分に拘泥する理由も希薄であろう。今回の検討、また、ごく最近のStoneらの報告を総合して考えると⁹⁾、Allikmetsの報告の真の価値は、加齢黄斑変性症に対する遺伝子解析を真剣に行うきっかけを作ったという点にあるとするのが一番妥当であろう。今後、ABCR以外の遺伝子異常についての解析が望まれる。

文献

1. Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, et al. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 1997; 277:1805-1807.
2. Allikmets R, Singh N, Sun H, et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding

transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nature Genet* 1997;15:236-246.

3. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1992;39:367-74.

4. Stone EM, Webster AR, Vandenberg K et al. Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration. *Nature Genet.* 1998;20:328-329.

5. Kuroiwa S, Kojima H, Kikuchi T, and Yoshimura N. ATP binding cassette transporter retina genotypes and age related macular degeneration: an analysis on exudative non-familial Japanese patients. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:in press.

表1 ABCR 遺伝子異常の頻度⁵⁾

Mutation	今回の検討		Allikmets らの報告	
	AMD (n = 80)	Control (n = 100)	AMD (n=167)	General population (n = 220)
E471K	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.2%)	0 (0%)
R1129L	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.6%)	0 (0%)
T1428M	7 (8.8%)	8 (8.0%)	1 (0.6%)	0 (0%)
R1517S	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.6%)	0 (0%)
I1562T	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.2%)	0 (0%)
G1578R	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.6%)	0 (0%)
5196 + 1G	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.6%)	0 (0%)
→A				
R1898H	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.6%)	0 (0%)
G1961E	0 (0%)	0 (0%)	6 (3.6%)	0 (0%)
L1970F	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.6%)	0 (0%)
6519Δ11bp	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.6%)	0 (0%)
D2177N	0 (0%)	0 (0%)	7 (4.2%)	1 (0.45%)
6568ΔC	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.6%)	0 (0%)
Totals	7 (8.8%)	8 (8.0%)	26 (16%)	1 (0.45%)

表2 今回の検討で見つかった新たな遺伝子異常⁵⁾

Mutations	Location	Nucleotide changes	Genotype	AMD (n = 80)	Control (n = 100)
P1116S	exon 23	CAC→CTT	homozygote	80 (100%)	100 (100%)
H1125L	exon 23	CAC→CTC	homozygote	80 (100%)	100 (100%)
Q1126L	exon 23	CAA→CTT	homozygote	80 (100%)	100 (100%)
L1844L	exon 41	CTG→CTC	homozygote	2 (2.5%)	1 (1%)
L1844L	exon 41	CTG→CTC	heterozygote	17 (21.3%)	28 (28%)
P1948P	exon 43	CCA→CCG	homozygote	2 (2.5%)	1 (1%)
P1948P	exon 43	CCA→CCG	heterozygote	17 (21.3%)	28 (28%)

19980849

報告書 P. 150－152は下記に掲載

ATP binding cassette transporter retina genotypes and age related macular degeneration: an analysis on exudative non-familial Japanese patients

Sachiko Kuroiwa, Hidenobu Kojima, Takanobu Kikuchi, Nagahisa Yoshimura

British Journal of Ophthalmology. Volume 83 Number 5, pp.613-615, 1999

カニクイザルに見出された黄斑変性眼網膜における メタロチオネインII (MT II)の局在に関する免疫組織化学的検討

Immunohistochemical localization of metallothionein II (MT II) in the retina of normal cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) and with early onset macular degeneration

Ruth M. 山藤¹、中村眞二²、藤木慶子¹、堀田喜裕¹、早川むつ子¹、金井淳¹、鈴木通 弘³、吉川泰弘⁴
(順天大・¹眼、²共同病理、³(株) 予防衛生協会、⁴東京大・農)

要約

免疫組織学的検索を行い、正常網膜にてMT IIの局在を調べ、疾患眼と比較した。カニクイザルの正常2個体2眼と黄斑部にドルーゼン状の変性を持つ1個体1眼を採取後、4%のparaホルムアルデヒドで固定、パラフィン切片を作成、免疫組織化学的検索をウシMT II抗体 (DAKO社) を用い、LSAB (Labeled Streptavidin Biotin) 法で行った。黄斑変性眼は透過型電子顕微鏡で観察した。ヘマトキシリン・エオジン染色では典型的なドルーゼン組織像は認められなかったが、網膜色素上皮細胞には、正常眼に比べ、色素が多く見られた。免疫染色では、正常眼網膜の色素上皮、外境界膜、外網状層、内顆粒層、神経線維層と内境界膜で抗MT II陽性であった。一方、疾患眼網膜では色素上皮、外網状層、神経線維層と内境界膜がわずかに抗MT II陽性であったが、外境界膜および内顆粒層は抗MT II陰性で、MT II遺伝子発現の抑制が免疫組織学的にも確認された。さらに、MT IIの低発現は色素上皮のみならず、網膜の他の層においても生じていることが分かった。

We studied the localization of MT II in the retina of normal cynomolgus monkey and with early onset macular degeneration by means of immunohistochemical technique. Materials and Methods>Two eyeballs of two normal cynomolgus monkeys and both eyeballs of a monkey with clinical signs of early onset macular degeneration were obtained by enucleation and fixed in 4% paraformaldehyde. The eyeballs of the two normal monkeys and one eyeball of the monkey with clinical signs of early onset macular degeneration were processed for light microscopy and immunohistochemical study. The remnant-affected eyeball was processed for electron microscopy. Immunohistochemical study was performed with bovine antibody to metallothionein II (DAKO Japan Co., Ltd.) using the LSAB method. Results>No typical drusen was observed in HE serial sections. However, the RPE cells in the eye with clinical signs of macular degeneration showed greater concentration of pigment, possibly due to lipofuscin accumulation. In the normal retina MT II immunostaining was observed in the RPE, in the external limiting membrane, in the outer plexiform layer, in the inner nuclear layer, in the nerve fibers layer, and in the inner limiting membrane. In the eye with clinical signs of macular degeneration, MT II immunostaining was observed with less intensity in the RPE, in the outer plexiform layer, in the nerve fibers layer, and in the inner limiting membrane. No immunostaining was observed in the external limiting membrane or in the inner nuclear layer. Conclusion>MT II immunostaining of retinal cells was observed with less intensity in the eye with macular degeneration suggesting lower levels of MT II, not only in RPE cells as reported previously, but also in other layers of the retina.

キーワード：カニクイザル、黄斑変性、メタロチオネインII、免疫組織化学

Key words: cynomolgus monkey, macular degeneration, metallothionein II, immunohistochemistry

メタロチオネインは低分子量のシステインを多く含む重金属結合蛋白質で、銅、亜鉛の濃度の調節、解毒に重要な働きをしている。さらに、フリーラジカルを除去する働きや、酸化ストレスからDNAの保護する役割を持つ^{1,2}。目におけるMTsの発現部位はラットで水晶体、角膜、色素上皮に発現していることが報告されている³。我々はカニクイザルに発生した家族性若年性黄斑変性の発症のメカニズムを解

析する目的で、疾患眼網膜の生化学的分子生物学的解析を施行し、抗酸化酵素の活性の有意な低下を認め、活性酸素の除去機能を持つMT II遺伝子の発現の抑制がみられたことから^{4,5}、本症の原因は網膜における過酸化水素および活性酸素の蓄積によると推測してきた。今回の研究は免疫組織学的検索を行い、正常眼におけるMT IIの局在を調べ、疾患眼と比較したので報告する。

試料および方法

国立予防衛生研究所筑波医学実験用霊長類センターにおいて飼育管理されているカニクイザル

(*Macaca fascicularis*) の正常2個体11歳3ヶ月と9歳10ヶ月各1眼ずつと黄斑部にドルーゼン状の変性を持つ1個体17歳5ヶ月の両眼球を採取した。得られた眼球は4%のパラホルムアルデヒドで固定した。

光学顕微鏡観察および免疫組織学的検討には、正常個体2眼、疾患個体1眼を用いた。黄斑部を含む後眼部を切除し、パラフィン包埋後、切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。免疫組織化学的検索はウシMTⅡ抗体 (DAKO社) を用い、LSAB (Labeled Streptavidin Biotin) 法で行った。

透過型電子顕微鏡観察のため、残りの疾患個体1眼を用い、2%グルタルアルデヒド再固定、2%オスミウム酸後固定、エポン包埋、酢酸ウラニール染色、クエン酸鉛染色による二重染色を行った。

結果

HE染色では疾患眼に典型的なドルーゼン組織像は認められなかったが、網膜色素上皮細胞内には、正常眼に比べ、色素の増加が見られ、一部はリポフスチン顆粒の蓄積によると考えられた (図1A、B)。リポフスチン顆粒は自発蛍光を示すことより、蛍光顕微鏡観察を施行した。疾患眼網膜色素上皮の蛍光性は、正常眼に比べ、多く見られた (図2A、B)。

免疫組織化学的検索では、正常眼では網膜の色素上皮、外境界膜、外網状層、内顆粒層、神経線維層と内境界膜で抗MTⅡ陽性であった (図3A)。一方、疾患眼網膜においてはわずかに色素上皮、外網状層、神経線維層と内境界膜が抗MTⅡ陽性であったが、外境界膜および内顆粒層は抗MTⅡ陰性であった (図3B)。

電子顕微鏡観察では疾患眼の網膜色素上皮に限局性の機能不全を示す所見が認められた。色素上皮細胞内のリポフスチン顆粒の蓄積、脂質沈着、Bruch膜のcollagenous zoneに無構造膜状、顆粒状の沈着物が認められた (図4、5)。ただし、ドルーゼン、basal linear deposit、basal laminar depositの組織像は見られなかった。

結論

以上の結果から、疾患眼においては前年度報告した競合的PCRによるMTⅡ遺伝子発現の抑制が免疫組織学的にも確認された。さらに、免疫組織化学的解析の結果から、MTⅡの低発現は色素上皮のみならず、網膜の他の層においても生じていることが分かった。これはヒト以外での哺乳類では初めての

報告で、ヒトのARMD (age-related macular degeneration) の研究結果と類似していることから、本疾患動物はヒトのARMDの動物モデルとして有用であることが示唆される。

文献

1. Sato, M. and Bremmer, I. (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol.Med.* 14, 325-337.
2. Chubatsu, L.S. and Meneghini, R. (1993). Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem. J.* 291,193-198.
3. Nishimura, h., Nishimura, N.,Kobayashi, S., and Tohyama, C. (1991). Immunohistochemical localization of metallothionein in the eye of rats. *Histochemistry* 95, 535-539.
4. Nicolas, M.G., Fujiki, K., Murayama, K., Suzuki, M.T, Shindo, N., Hotta, Y., Iwata, F., Fujimura, T., Yoshikawa, Y., Cho, F. and Kanai, A. (1996). Studies on the mechanism of early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys. II. Suppression of metallothionein synthesis in the retina in oxidative stress. *Exp. Eye Res.* 62, 399-408.
5. 藤木慶子、堀田喜裕、猿橋直子、早川むつ子、金井淳、鈴木通弘、吉川泰弘 (1997).カニクイザルに観察された家族性若年性黄斑変性におけるメタロチオネインIIの発現について。厚生省特定疾患網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班1997年度 28-31.
6. Tate Jr., D.J., Newsome, D.A., Oliver, P.D. Metallothionein shows an age-related decrease in human macular retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 23 48-2351.

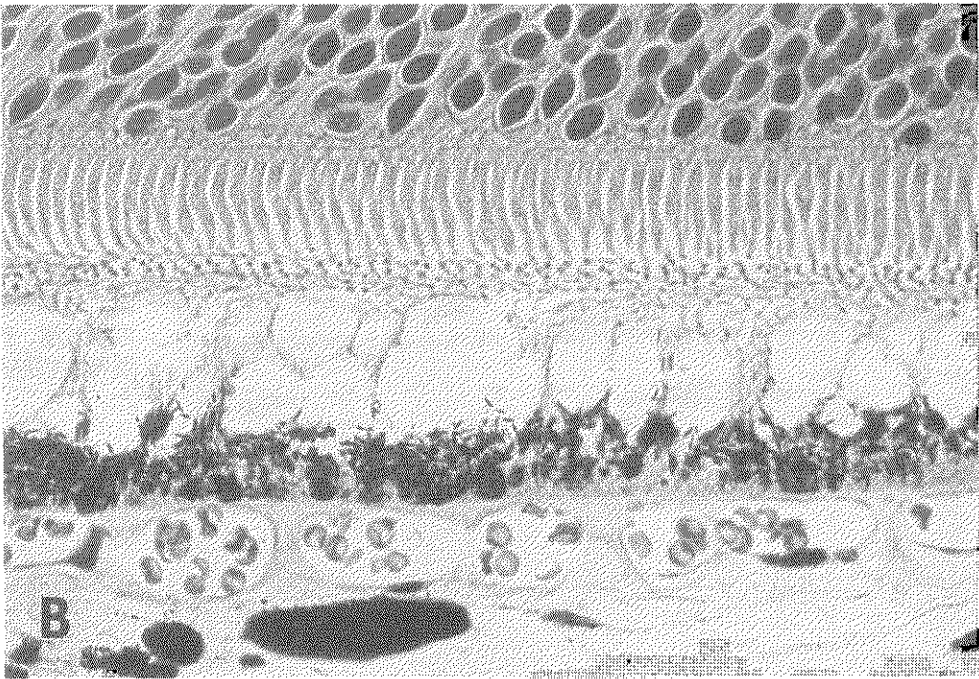
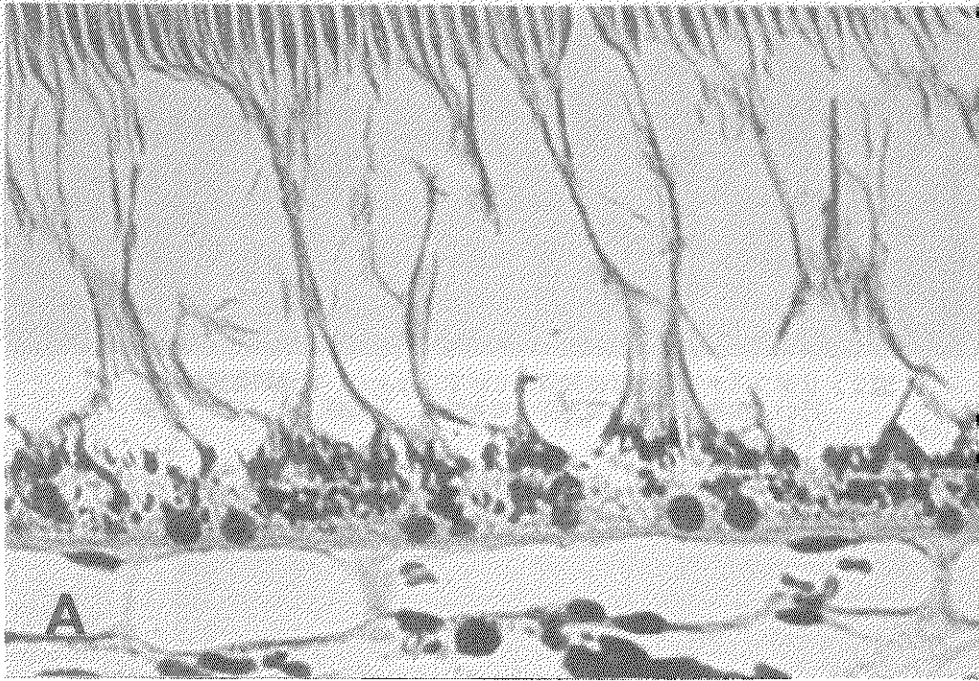


図1) HE染色では疾患眼に典型的なドレーゼン組織像は認められなかったが、網膜色素上皮細胞内には、正常眼(A)に比べ、色素の増加が見られる(B)。



図2) リポフスチン顆粒は自発蛍光を示すことより、蛍光顕微鏡観察を行い、疾患眼網膜色素上皮の蛍光性は、正常眼(A)に比べ、多く見られた(B)。

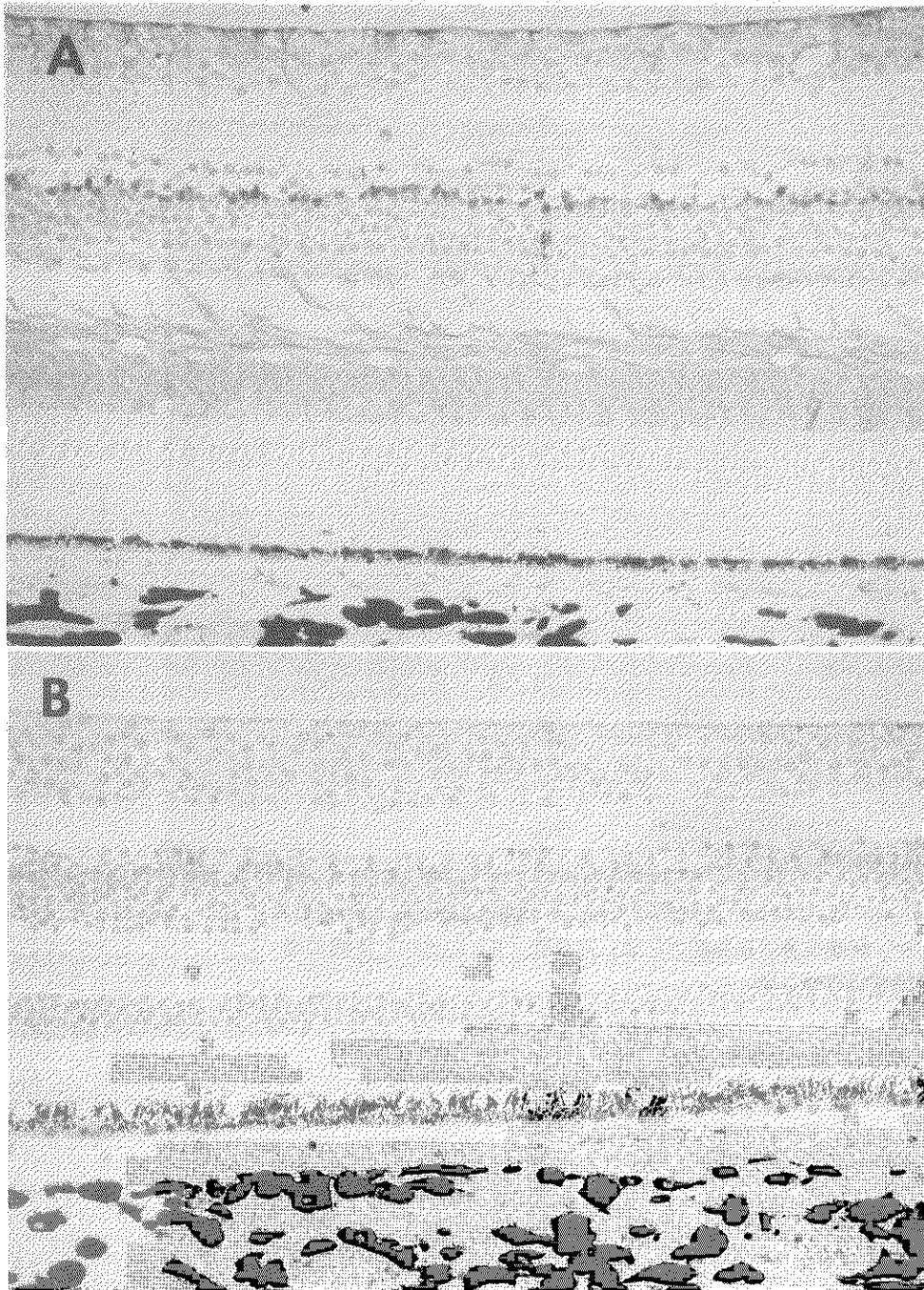


図3
A) 正常眼では網膜の色素上皮、外境界膜、外網状層、内顆粒層、神経線維層と内境界膜で抗MT II陽性であった。

図3
B) 疾患眼網膜ではわずかに色素上皮、外網状層、神経線維層と内境界膜が抗MT II陽性であったが、外境界膜および内顆粒層は抗MT II陰性であった。

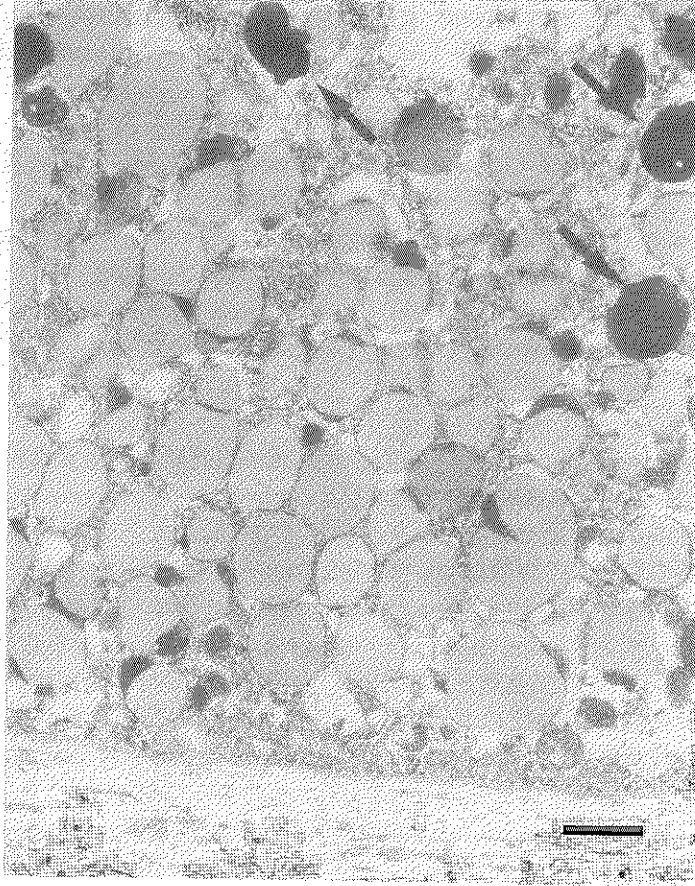


図4) 電子顕微鏡観察では疾患眼の網膜色素上皮に限局性の機能不全を示す所見が認められ、色素上皮細胞内のリポフスチン顆粒(矢印)、多数のlipidを含む空胞が見られた。(×12,800、バー:1μm)

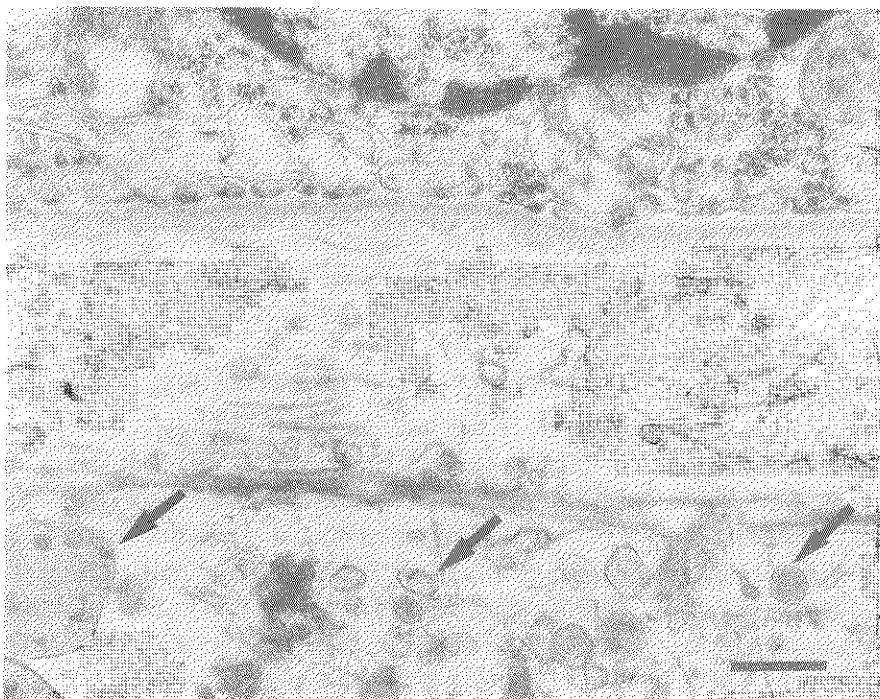


図5) Bruch膜のcollagenous zoneに多数の無構造膜状、顆粒状の沈着物が認められた。(×32,000、バー:0.5μm)

加齢黄斑変性とadvanced glycation end products (AGEs)

Advanced glycation end products (AGEs) in age-related macular degeneration

石橋達朗 (九州大学医学部眼科)

Tatsuro Ishibashi (Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University)

村田敏規 (ドヘニー眼研究所)

Toshinori Murata (Department of Ophthalmology, Doheny Eye Institute)

永井竜児、堀内正公 (熊本大学医学部第二生化学)

Ryoji Nagai, Seikoh Horiuchi (Department of Biochemistry,
Kumamoto University School of Medicine)

最近、Advanced glycation end products (AGEs) が加齢や血管新生に重要な役割を果たしていることが分かってきた。我々はAGEsの重要な構成成分であるN-(carboxymethyl)lysine (CML)の沈着を、高齢者の眼球および加齢黄斑変性眼から手術で切除した新生血管膜で検討した。8眼の凍結した新生血管膜、12眼の高齢者の眼球12眼、1眼の若年者の眼球についてCMLの局在を免疫組織化学的に検討した。また網膜色素上皮細胞の同定にはサイトケラチンの免疫染色を行った。高齢者の眼球12眼のうち8眼には、加齢黄斑変性の前駆病変である軟性ドルーゼンやbasal laminar/basal linear depositがみられた。これらの病変にはCMLの沈着がみられたが、近接する網膜色素上皮細胞への沈着は認められなかった。これに対して、新生血管膜に存在する網膜色素上皮細胞にはCMLの沈着がみられた。AGEsの前駆病変や網膜色素上皮細胞への沈着が、加齢黄斑変性症の脈絡膜新生血管の発生進展に関与していることが示唆された。

Recently, advanced glycation end products (AGEs) have been found to play an important role both in aging changes and neovascularization. We investigated the localization of N-(carboxymethyl) lysine (CML), a component and major immunologic epitope of AGEs, in aged eyes and choroidal neovascular membranes (CNVMs) surgically excised from eyes with age-related macular degeneration (ARMD). Immunohistochemistry for CML was performed using 8 snap-frozen CNVMs, 12 eyes from aged people and 2 eyes from young people. Immunohistochemistry for cytokeratin was also performed as the judgment of retinal pigment epithelial (RPE) cells. The predisposing findings of ARMD such as soft drusen, basal laminar and basal linear deposits were observed in 8 of 12 aged eyes. Each case showed CML accumulation, while overlying RPE cells showed no accumulation in all 12 eyes. In CNVMs, however, RPE cells showed CML accumulation in their cytoplasm. Localization of AGEs in the predisposing findings and RPE cells may lead to a better understanding of the pathogenesis of ARMD.

Key words: age-related macular degeneration (ARMD), advanced glycation end products (AGEs), N-(carboxymethyl)lysine (CML), choroidal neovascular membranes (CNVMs), retinal pigment epithelial (RPE) cells, vascular endothelial growth factor (VEGF), drusen, basal laminar and linear deposits

目的

加齢黄斑変性age related macular degeneration 滲出型 (ARMD) は、高齢者の黄斑に脈絡膜由来の新生血管が網膜色素上皮細胞下や網膜下に伸展し、出血や滲出性病変を生じ、最終的には瘢痕組織を形成する疾患である。その病態には血管新生が関与し、糖尿病網膜症とともに眼内血管新生性疾患の双壁となっている。ARMDにおける脈絡膜新生血管の発生機序は未だ明らかではないが、網膜

色素上皮細胞やブルッフ膜の異常が指摘され、前駆病変としてドルーゼン、basal laminar/basal linear depositなどがみられる。一方、多くの生体蛋白は非酵素的糖付加反応 (グリケーション) を受け、その最終産物がadvanced glycation end products (AGEs) である。最近、AGEsと糖尿病網膜症の関係が明らかになってきているが¹⁾、加齢や血管新生への関与も指摘されている²⁾。我々は高齢者に生じる血管新生性疾患であるARMDとAGEs

の関係を調べるために、高齢者の眼球およびARMDの患者眼から切除した新生血管を含んだ増殖組織におけるAGEsの沈着を検討した。

方法

材料として、ARMD患者から手術の際に切除した新生血管膜8例、ARMDおよび糖尿病網膜症を有しない高齢者の摘出眼球12眼(69-82歳)、若年者の摘出眼球1眼(21歳)を使用した。AGEsの局在を検討するために、それぞれの凍結切片を作製し、AGEsの重要な構成成分であるN-(carboxymethyl)lysine (CML)に対する抗体を用いて免疫染色を行った。また網膜色素上皮細胞の同定にはサイトケラチンの染色を行った。

結果

高齢者の摘出眼球12眼のうち8眼には、ARMDの前駆病変である軟性ドルーゼンやbasal laminar/basal linear depositが網膜色素上皮細胞の下にみられた。これらの前駆病変のほとんどにCMLの沈着がみられたが、近接する網膜色素上皮細胞への沈着は認められなかった(図1)。これに対して、ARMDの新生血管膜に存在する網膜色素上皮細胞にはCMLの沈着が8例全部にみられた(図2)。

考案

眼内には種々の血管新生促進因子が存在するが、なかでも血管内皮増殖因子vascular endothelial growth factor (VEGF)が注目されている。VEGFの遺伝子発現には虚血あるいは低酸素が重要な役割を果たし、糖尿病網膜症では血管新生の前に網膜血管の閉塞域が生じる。ARMDにおいても脈絡膜虚血の報告があるが、糖尿病網膜症ほど明らかではない³⁾。虚血以外の因子として、最近AGEsが注目されている。AGEsは網膜色素上皮細胞や内皮細胞に作用してVEGFを発現させる^{4,5)}。今回みられたARMDの前駆病変や網膜色素上皮細胞におけるAGEsの沈着はVEGF発現を促進し、脈絡膜新生血管の発生、進展に関与していることが示唆された。

またAGEsはARMDの増殖組織の形成にもかかわっている可能性がある。AGEsはtransforming growth factor β などを介して、線維化を促進する⁶⁾。さらにAGEsの産生は酸化ストレスの亢進と密接な関係があり⁷⁾、活性酸素の発生はブルッフ膜などを障害して新生血管の伸展を促進することが考えられる。

結語

AGEs (CML) はARMDの前駆病変や網膜色素上皮細胞に沈着し、ARMDの脈絡膜新生血管の発生

に関与していることが示唆される。

文献

- 1) Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomata H, Ikeda K, Horiuchi S: The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* 40:764-769, 1997.
- 2) Brownlee M: Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Ann Rev Med* 46:223-234, 1995.
- 3) Friedman E: A hemodynamic model of the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 124:677-682, 1997
- 4) Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R, Adamis AP: Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 101:1219-1224, 1998.
- 5) Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M, Yamamoto H: Advanced glycation end products-driven Angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 272:8723-8730, 1997.
- 6) Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert RE: Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest* 99:1016-1027, 1997.
- 7) Nagai R, Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Araki T, Horiuchi S: Hydroxyl radical mediates N-(8-carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem Biophys Res Commun* 234:167-172, 1997.

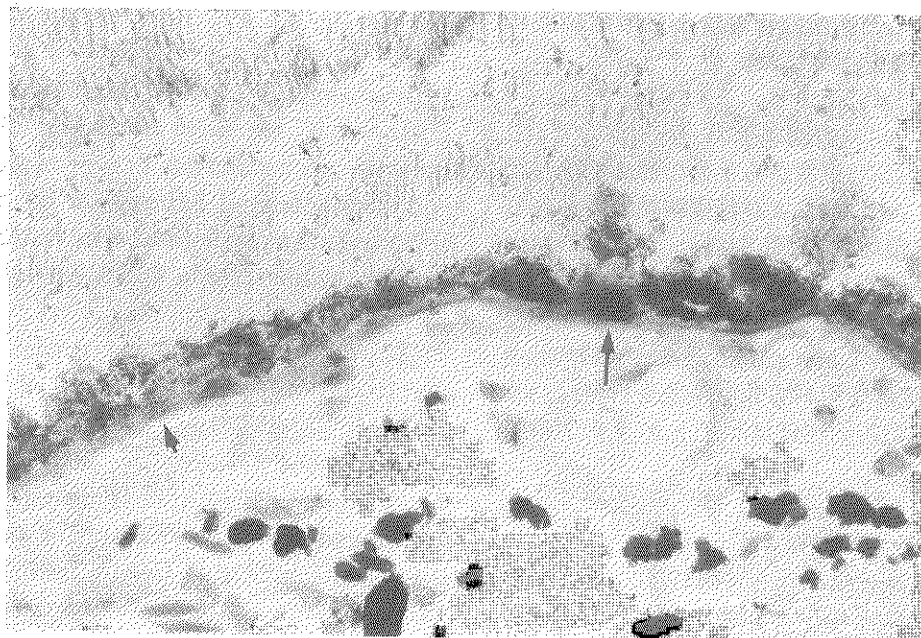


図1：軟性ドルーゼン(長い矢印)、basal laminar/basal linear deposit (短い矢印)にCMLの沈着がみられる。

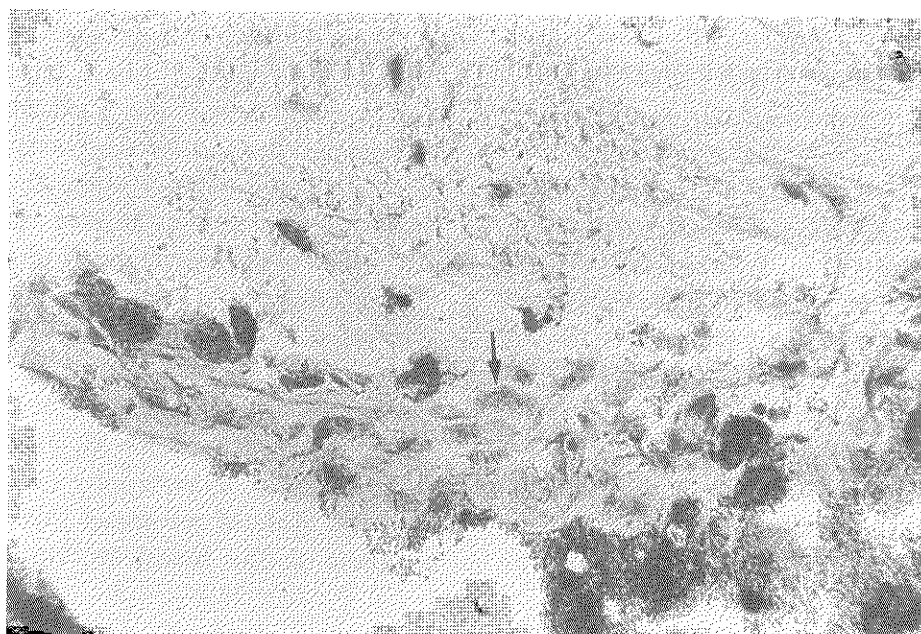


図2：新生血管膜の網膜色素上皮細胞にCMLの沈着がみられる(矢印)。

19980849

報告書 P. 161－164は下記に掲載

**Advanced Glycation End Products in Age-related Macular Degeneration
(Laboratory sciences)**

Tatsuro Ishibashi, Toshinori Murata, Masanori Hangai, Ryoji Nagai, Seikoh
Horiuchi, Pedro F. Lopez, David R. Hinton, Stephen J. Ryan
Archives of Ophthalmology. Volume 116, pp.1629-1632, 1998

19980849

報告書 P. 165－170は下記に掲載

The relationship between accumulation of advanced glycation and products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas

T. Murata, R. Nagai, T. Ishibashi, H. Inomata, K. Ikeda, S. Horiuchi
Diabetologia. Volume 40, pp.764-769, 1997

実験的脈絡膜新生血管発生過程における血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその受容体 (KDR)、形質転換成長因子 (TGF β) 受容体の発現

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and its receptor (KDR/flk) mRNA, Transforming Growth Factor- β receptors mRNA in Experimental Choroidal Neovascularization.

緒方 奈保子、高橋 寛二、和田 光正、山中 理江、宇山 昌延 関西医科大学
Nahoko Ogata, Kanji Takahashi, Mitsumasa Wada, Rie Yamanaka, Masanobu Uyama
Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

抄録

ラット実験的脈絡膜新生血管発生過程における血管内皮細胞増殖因子vascular endothelial growth factor (VEGF) およびその受容体である kinase insert domain containing receptor (KDR) の発現、また形質転換成長因子 transforming growth factor (TGF) β receptor I, II (T β RI, T β RII) の発現を *in situ* hybridization 法、免疫組織学的方法にて検討した。VEGF、KDR mRNA の発現は、光凝固後 3 日 - 1 週の早期に脈絡膜新生血管組織内の血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞、線維芽細胞に強くみられた。T β RI および T β RII の発現は、光凝固後早期に新生血管発生部の macrophage 様細胞、網膜色素上皮細胞に、2 週では血管内皮細胞周囲に強く見られた。脈絡膜新生血管形成過程において VEGF また TGF β が autocrine、paracrine 的に血管新生に作用していると推測された。さらに、TGF β と VEGF が、互いに関与して血管新生に働く可能性が示唆された。

We investigated the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (KDR/flk) and transforming growth factor (TGF) β receptor type I (T β RI) and type II (T β RII) in a rat model of experimental choroidal neovascularization induced by laser photocoagulation. The expression was investigated using *in situ* hybridization and immunohistochemical methods. Three days to week after photocoagulation, expression of VEGF and KDR mRNA was strongly detected in retinal pigment epithelial cells, fibroblast-like cells and the endothelium of neovascular region. Expression of T β RI and T β RII was also detected in retinal pigment epithelial cells, fibroblast-like cells and the endothelium of the neovascular region, then T β RI and T β RII was especially strong in the endothelium of the choroidal neovascularization at 2 weeks. Therefore we supposed that an autocrine and/or paracrine pathway may be a plausible mechanism of VEGF and TGF- β for the signal induction in the neovascularization. Our findings also suggest the interaction between VEGF and TGF- β in the process of choroidal neovascularization.

キーワード

1. vascular endothelial growth factor (VEGF)
2. kinase insert domain-containing receptor (KDR)
3. transforming growth factor (TGF) β
4. transforming growth factor (TGF) β receptor type I (T β RI)
5. transforming growth factor (TGF) β receptor type II (T β RII)
6. choroidal neovascularization
7. laser photocoagulation
8. *in situ* hybridization
9. immunohistochemical method
10. neovascularization

緒言

血管内皮細胞成長因子vascular endothelial growth (VEGF) は、血管内皮細胞の増殖を特異的に促進し、新生血管の発生に大きな役割を果たすこと知られている。また、形質転換成長因子transforming growth factor (TGF) β は、in vivoでは血管新生を間接的に促進すると言われており、我々は実験的脈絡膜新生血管発生過程において新生血管組織におけるTGF β の発現が増強することを報告している¹⁾。TGFがVEGFの発現を誘導するとの報告もあり²⁾、本研究では実験的脈絡膜新生血管発生過程におけるVEGFおよびその受容体であるkinase insert domain containing receptor (KDR) の発現、またTGF β receptor I, II (T β R I, T β R II) の発現をin situ hybridization法、免疫組織学的方法にて検討した。

実験方法

成熟有色ラットの後極部眼底にクリプトンレーザーで強度の光凝固を行い、脈絡膜新生血管を実験的に作成した。光凝固後3日、1週、2週、4週に眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定の後、急速冷凍、クライオスタットにて約8 μ mの薄切切片を作成した。1) in situ hybridization法: Rat VEGF cDNA、ratKDR cDNA、またHuman T β R I および T β R II cDNA からジゴキシゲン (DIG) 標識非放射性RNAアンチセンスプローブおよびコントロールセンスプローブを作成。切片をprotenase K、acetic anhydrideによる前処置の後、摂氏55度で16時間、それぞれのプローブとhybridizationを行い、その後洗浄、抗DIG抗体で抗体反応を行ったのち、BCIPとNBTでmRNA発現部位を紫色に発色させ、メチルグリーンで対比染色を行った。2) 免疫組織学的検索: LSAB法で1次抗体にhuman T β R I抗体もしくはT β R II抗体 (Santa Cruz)、2次抗体にgoat anti-rabbit or anti-mouse IgGを用い、DABで発色、メチルグリーンで対比染色を行った。

結果

正常網脈絡膜ではVEGFおよびKDR mRNAの発現は神経節細胞に強く、内顆粒層の一部に弱くみられた。T β R IおよびT β R II mRNAの発現も神経節細胞にみられた。T β R IおよびT β R II蛋白質は、神経節細胞および網膜色素上皮細胞にみられた。脈絡膜新生血管形成過程ではVEGF、KDR mRNAの発現は、光凝固後の3日の早期より新生血管発生部にみられ(図1) 1週では脈絡膜新生血管組織内の血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞、線維芽細胞に強くみられた(図2)。2週でも、みとめられたが発現

は弱まり、4週ではほとんどみられなくなった。

T β R IおよびT β R II mRNAの発現は、光凝固後3日の早期より新生血管発生部にみられ、T β R IおよびT β R II抗体に対する反応も同様に、新生血管発生部のmacrophage様細胞、網膜色素上皮細胞にみられた。1週では脈絡膜新生血管愛皮細胞や網膜色素上皮細胞、線維芽細胞に発現がみられ(図3)、2週では脈絡膜新生血管内皮細胞に局限して発現が見られるようになった。(図4)が、4週後にはその発現は弱まった。

考案

VEGFおよびKDR mRNAの発現の結果から正常網膜では神経節細胞がVEGFの産出細胞であり、VEGFがオートクライン的に働いている³⁾ことが示唆された。さらにT β R IおよびT β R II mRNAの発現は神経節細胞に、T β R IおよびT β R II蛋白質は神経節細胞と網膜色素上皮細胞にみられた。TGF β がオートクライン、パラクライン的に働いていることが明らかとなった。実験的脈絡膜新生血管形成過程においてVEGF、KDR mRNAの発現は脈絡膜新生血管組織内の血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞、線維芽細胞にみられたことから新生血管の発生から退縮にいたる過程でVEGFが、その受容体であるKDRを介してオートクラインまたパラクライン的に作用していることが示唆された。さらに網膜色素上皮細胞がVEGFおよびKDRを発現していたことから網膜色素上皮細胞がVEGFを介して脈絡膜新生血管の発生、進展に関与していると推測された。TGF β が実験的脈絡膜新生血管形成過程でその発現が増強することが報告されており¹⁾ T β R IおよびT β R IIの発現もmacrophage様細胞、血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞、線維芽細胞にみられたことから、脈絡膜新生血管形成過程においてTGF β がautocrine、paracrine的に血管新生に作用していると推測された。TGFがVEGFの発現を誘導するとの報告もあり²⁾ TGF β とVEGFが互いに関与して血管新生に働くことが推察された。

引用文献

1. Ogata N, Yamamoto C, Miyashiro M, Matsushima M, Uyama M, Expression of transforming growth factor β mRNA in experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res.* 1997;16:9-18
2. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol*