

LoVE を用いた小児の視機能評価

Evaluation of visual function in children using Low Vision Evaluator (LoVE)

板橋俊隆、國方彦志、中川陽一、和田裕子、佐藤 肇、川村后幸、
西郷陽子、太田五月、遠藤五月、玉井 信
東北大眼科

T. Itabashi, H. Kunikata, Y. Nakagawa, Y. Wada, H. Sato,
M. Kawamura, Y. Saigo, S. Ota, S. Endo, M. Tamai
Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

【抄録】

目的：光覚測定装置 LoVE (Low Vision Evaluator) は重度視力障害者における視機能評価を目的とした測定機器である。本装置が小児を対象とした場合においても有用であるかを確認する。

対象及び方法：(1)小学1～6年生までの学童43例と、(2)3～6才までの小児28例を対象とした。LoVEは測定の信頼性の指標として検査スキルの中に無発光刺激を組み込んであり、偽陽性応答がエラースコアとして表示されるが、これについて検討した。

結果：(1)小学生全体のエラースコアの平均値は 0.67 ± 1.17 であり、成人と比較すると有意に大きかったが、学年による差を認めなかった。(2)3才児の平均値は 2.75 ± 2.06 で、4才以上と比較して有意な上昇を認めた。

結論：小学生においては成人との比較ではエラースコアが高値を示したが、検査結果は十分信頼できるものと考えられた。就学以前の小児において、4才以上ではLoVEによる検査が可能であると考えられた。

Purpose: Low Vision Evaluator (LoVE) is a novel device for evaluating low visual function. Purpose of this study is to assess the visual function in children with severe eye disease.

Methods: Forty three elementary school children (1) and 28 pre-schoolers over 3-year-old (2) were examined with LoVE. Error scores for pseudo positive responses were analyzed respectively.

Results: (1) Average of the error scores was 0.67 ± 1.17 that was significantly increased than the adult's. There were not any significant changes in the six grades. (2) Average of the error scores in 3-year-old patients was significantly increased than that of 4 - 6 year old.

Conclusion: It was possible to examine child patients over 4-year-old using LoVE.

キーワード：LoVE、光覚測定、視機能評価、小児、小学生

Key Words：LoVE, Low Vision Evaluator, visual function, children, elementary school children

緒言

今日まで小児の自覚的な視機能評価法としては、Teller Acuity Card、Dot Card、Landolt 環による視力測定、Goldmann 動的量的視野による視野測定などが用いられてきた。しかし低視力の患児における視機能評価はこれら従来の検査法を用いても非常に困難である。そこで、網膜色素変性などの重症眼疾患の視機能を簡便に再現性を持って評価する事を目的として開発した Low Vision Evaluator (LoVE)^{1) 2)}を用いて、小児に対する光覚測定を行い、十分に信頼性のある結果が得られるか否かと、検査可能な年齢について検討した。

対象及び方法

グループ1：小学生

当科を受診した小学1年生から6年生までの学童43例（男児23例、女児20例）を対象とした。各症例の眼疾患は網膜色素変性、未熟児網膜症、ステロイド白内障、斜視、眼瞼下垂、ぶどう膜炎など様々であった。

グループ2：就学前の小児

当科を受診した就学以前の3才～6才までの様々な眼疾患の小児28例を対象とした。疾患は未熟児網膜症、角膜白斑、斜視などであった。

グループ1においては従来型のLoVEを使用し、グループ2においては、瞳孔間距離や頭囲の小さな小児においても装着が容易となるよう改良を加えた発光用ゴーグルを使用した。

LoVEによる測定は、先に報告したと同様にスキップモードを用い、暗順応せずに通常の眼科外来診療用暗室にて行った。LoVEは測定の信頼性をはかる指標として検査スキルの中に無発光刺激を組み込んであり、無発光刺激は1回の測定(60回の発光刺激)の間に6回行われるが、それに対する偽陽性応答と発光前の応答の回数が、エラースコアとして結果に表示される。このエラースコアについてそれぞれのグループで比較検討した。

結 果

グループ1. 小学生全体でのエラースコアの平均値は 0.67 ± 1.17 であった。これは成人網膜色素変性患者122例の平均値 0.08 ± 0.57 と比較すると有意に大きい値であった ($p < 0.0001$)。学年別では、1年生(13例26眼)は 0.46 ± 1.10 、2年生(7例14眼)は 0.43 ± 0.51 、3年生(7例14眼)は 1.14 ± 1.79 、4年生(2例4眼)は 0.00 、5年生(8例16眼)は 1.00 ± 1.26 、6年生(6例11眼)は 0.64 ± 0.81 であり、学年間に有意差を認めなかった。

2. 就学前の3才~6才の小児の年齢別のエラースコアの平均値は、3才では 2.75 ± 2.06 、4才では 0.88 ± 1.46 、5才では 0.56 ± 0.87 、6才では 0.57 ± 0.87 であり、3才児においてのみ有意なエラースコアの上昇を認めた。

考 案

光覚測定装置 LoVE は重度視力障害患者に対しての視機能評価法の確立を目指して開発されたものである。我々は、網膜色素変性や緑内障重症例において、その視機能評価法として LoVE が有用であることをこれまでに報告してきた。^{1) 2)} これらは何れも成人を対象としたものであったが、本装置の検査法は非常に簡便であり、この特徴を生かし従来の検査法では機能評価の難しい小児を対象とした場合においても検査が可能であるかは非常に興味を持たれるところであった。

今回の小学生全体のエラースコアの平均値 0.67 ± 1.17 は、成人の平均 0.08 ± 0.57 と比較すると有意に大きかった。しかし、6回の無発光刺激に対して0.67回(約11%)の偽陽性応答であり、この検査結果を十分に信頼出来るものであると考えた。

また就学前の小児では、3才児においてエラースコアの有意な上昇を認めたが、4才から6才では小学生と比較しても差は認められなかった。以上より LoVE による光覚測定が可能である年齢は概ね4才以上であると考えられた。

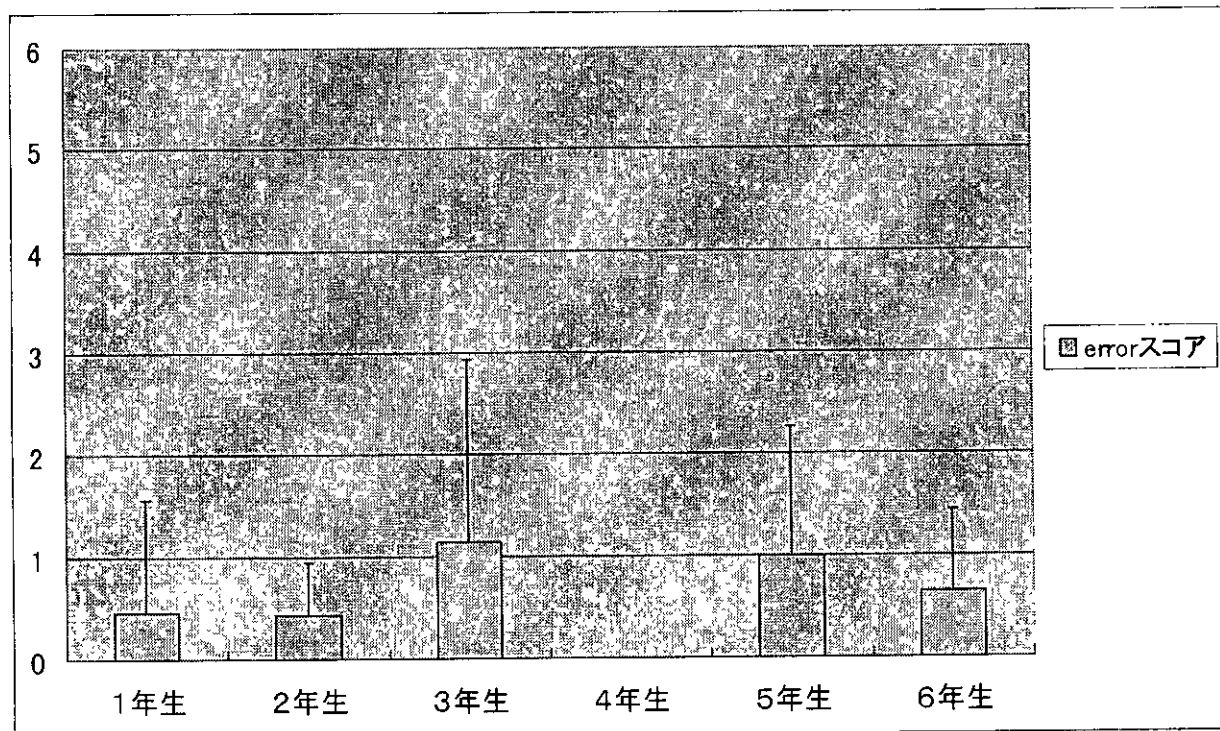
LoVEによる測定は、ERGやGoldmann暗

順応計のような特殊な検査環境を必要とせず、1回の測定に要する時間は2分弱と短時間であり、簡便かつ非侵襲的に検査を行うことが可能である。実際、今回対象とした小児においても、検査中に不快を訴える場合は殆どなく、滞りなく検査を終了することができた。小児を対象とした場合においても LoVE は十分実用に耐えうるものであり、その視機能評価法として有用であると思われる。

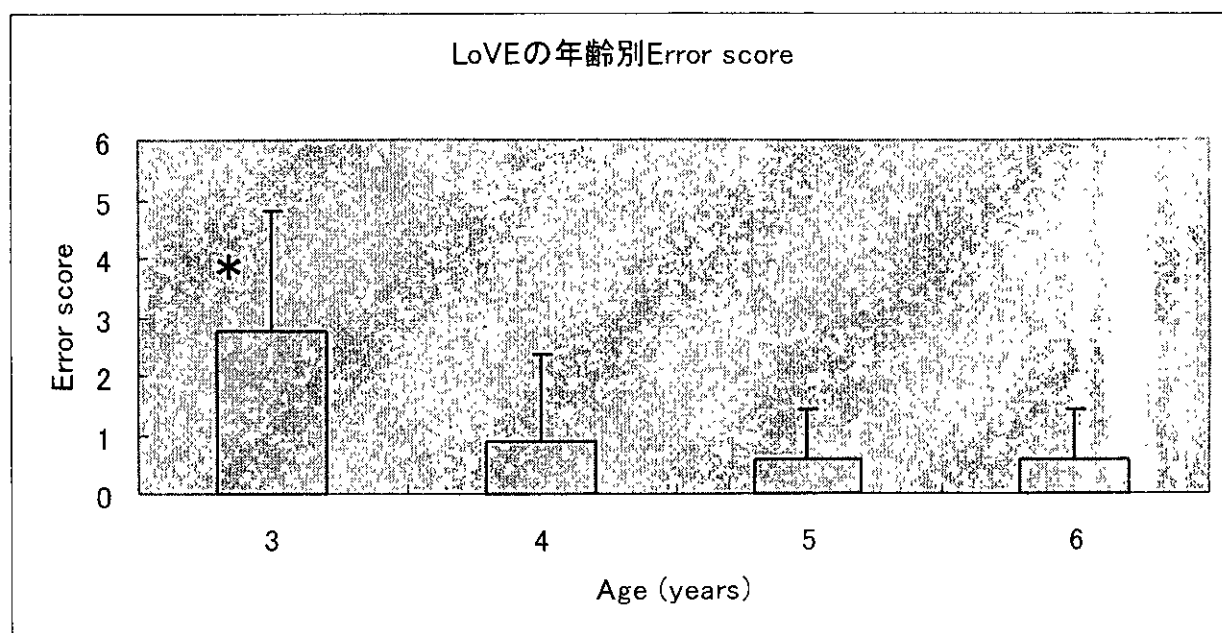
文 献

- 1) 國方彦志、中川陽一、角田雅宏、玉井信：重度低視力患者の視機能評価とその測定機器 Low Vision Evaluator の開発。日眼会誌105：161-166、2001
- 2) 板橋俊隆、中川陽一、和田裕子、佐藤肇、川村后幸、玉井信：LoVE (Low Vision Evaluator) による網膜色素変性症治療薬(ヘレニエン)の評価。厚生労働省特定疾患 網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班 平成12年度研究報告書：239-242、2001

学年とエラースコアの平均値



年齢別エラースコアの平均値



エレクトロポレーション法による結膜濾過胞への遺伝子導入

Gene transfection into rabbit conjunctiva by in vivo electroporation

間宮和久、大黒 浩、丸山幾代、高野淑子、山崎仁志、日時友美、宮川靖博、石川 太、中沢 満 (弘前大学)

Kazuhisa Mamiya, Hiroshi Ohguro, Ikuyo Maruyama, Yoshiko Takano, Hitoshi Yamazaki,
Tomomi Metoki, Yasuhiro Miyagawa, Futoshi Ishikawa, Mitsuru Nakazawa
Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

【抄録】

目的：緑内障濾過手術における遺伝子治療の可能性を追求するため、エレクトロポレーション法による結膜濾過胞への vector 遺伝子導入の安全性と効果を検討した。

方法：vector (0.05-0.5mg/ml) を含む緩衝液 (PBS) をエレクトロポレーションにて家兎結膜上皮細胞に導入した。遺伝子導入の効果を検証するため pTracer CMV-2 vector (Invitrogen®) にあらかじめ組み込まれている green fluorescent protein (GFP) 遺伝子の発現を免疫組織化学的に検討した。

結果：GFP 発現は手術後 3-30日間に結膜上皮細胞内に認められることが確かめられた。組織学的には異常細胞などはみられなかった。

考察：エレクトロポレーション法は、緑内障濾過手術での結膜濾過胞維持に関与する何らかの因子の遺伝子導入に有効な手段であることが考えられた。

Purpose: To develop the gene therapy to glaucoma-filtering surgery, we transfected pTracer-CMV2 vector (Invitrogen®) into rabbit conjunctiva via electroporation and studied effects of gene delivery.

Method: 0.1 ml of each vector DNA (0.05-0.5mg/ml) in phosphate buffered saline (PBS) were alternatively transfected into white rabbit conjunctiva via electroporation. 7 days and 30 days after transfection, rabbits were sacrificed and these conjunctivas were examined expression of green fluorescent protein (GFP).

Results: Expression of GFP was confirmed in conjunctival epithelium during 7 days and 30 days after transfection. No abnormality observed around tissues.

Conclusions: This data indicates that electroporation is useful to transfect some genes that promote the formation of bleb in glaucoma surgery.

キーワード：緑内障濾過手術、遺伝子導入、electroporation、green fluorescent protein (GFP)、家兎結膜

緒言

現在、緑内障濾過手術は多くの症例に施行されているものの、長期間安定した効果を維持するのが困難な症例があり、またマイトマイシン C 併用に伴う合併症や感染が問題となっている。そこで今回、遺伝子導入を活用した新しい緑内障手術の開発を目指して、エレクトロポレーション法での結膜への遺伝子導入の可能性を検討した。エレクトロポレーション法は、導入部位に高電圧パルスを与え、細胞膜に可逆的な小孔を形成させ、小孔が閉鎖するまでの間に、外液とともに DNA を細胞内に流入させることにより、遺伝子、薬剤、抗体などを導入する方法で、主に competent cell や培養細胞の遺伝子導入に幅広く応用され、低電圧での遺伝子導入が可能になり、生体への遺伝子導入にも活用されている。また、ウイルスベクターと異なり、局所的な導入が可能である。眼

球においてもエレクトロポレーション法を用いて網膜神経節細胞への導入が行なわれており¹⁾、今回エレクトロポレーション法を遺伝子導入法として選択した。

方法

導入するベクターは発現性の強い CMV promoter を有し、green fluorescent protein (GFP) を発現する invitrogen 社の pTracer-CMV2 を使用した (図 1)。まず白色家兎結膜に 0.05~0.5mg/ml のベクター DNA 溶液を各 0.1 ml づつ結膜下に注入し、濾胞を形成させた後、cup 電極を用いて、エレクトロポレーション法にて遺伝子を導入した (図 2、3、4)。コントロールには、1 X phosphate buffered saline (PBS) を 0.1ml 注入し、同様に cup 電極にて通電した。遺伝子発現を確かめるために、導入後 7 日目と

30日目に安楽死させた家兎より眼球摘出し、結膜を切除、固定（4%パラホルムアルデヒド）し、抗 GFP 抗体にて免疫組織学的検討を行なった。

結果

抗 GFP 抗体による免疫組織学的検討では、導入7日目に強い染色を認め、30日後でも GFP 発現を認めており、結膜への遺伝子導入が確認された。また、周囲の結膜組織には、明らかな異常は認められなかった。

考察

エレクトロポレーション法による遺伝子導入法は、1997年 Sakamoto ら²⁾ によってエレクトロポレーション法と線維増殖抑制剤である bleomycin を併用した緑内障濾過手術の報告がある。この報告では drug delivery の方法として

エレクトロポレーション法を選択しており、その効果は20日間までの短期間であるが、エレクトロポレーション法単独、bleomycin 単独のものより眼圧コントロールは有効であった。今回、gene delivery を目的としてエレクトロポレーション法を使用し、結膜への遺伝子導入が確認されたのは、今後の緑内障手術での遺伝子導入の活用への第一歩であると思われる。

文献

- 1) Dezawa M et al.: gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: micron (33) 1-6, 2002
- 2) Sakamoto T et al.: electroporation and bleomycin in glaucoma-filtering surgery: IOVS 38 (13) 2864-68, 1997

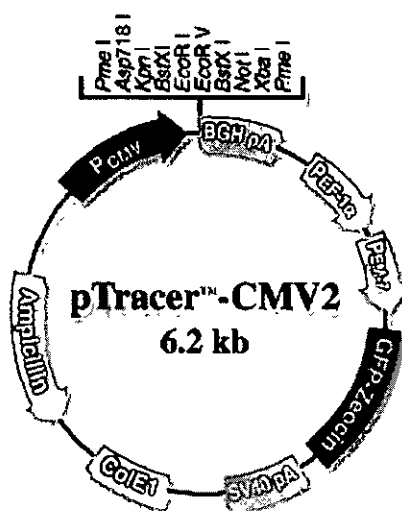


図1 DNA construct

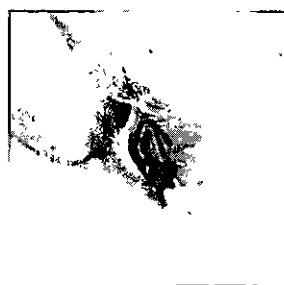


図2 結膜下注射



図3 濾過胞形成



図4 遺伝子導入
cup 電極を使用し、結膜に遺伝子を導入する。

神経保護因子導入細胞移植の局所および、全身の反応

Local and systemic reaction after neurotrophic factor gene-transfected cell transplantation.

阿部俊明¹、西郷陽子²、北条昌芳²、菅野江里子²、富田浩史²、吉岡由貴²、鹿野哲也²、玉井 信²

1：東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター先進医療開発部門細胞治療開発分野

2：東北大学大学院医学系研究科感覚器病態学講座眼科学分野

Toshiaki Abe¹, Yoko Saigo², Masayoshi Hojo², Eriko Sugano²,

Hiroshi Tomita², Yuki Yoshioka², Tetsuya Kano², Makoto Tamai²

1: Division of clinical cell biology, Department of Translational Research, Center for Translational and Advanced Animal Research on human Diseases, Tohoku University School of Medicine

2: Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

【抄録】

目的：神経保護因子導入細胞移植の局所および、全身の反応の検討

方法：ラット RPE に BDNF、bFGF、Axokine 遺伝子が安定して発現する細胞を作製した。目的の神経保護因子以外にマーカーとして EGFP も同時に発現させ、移植後に cell sorter で回収し、網膜下での目的遺伝子の発現を real-time PCR で確認した。MHC-I、-II の発現も確認した。また移植された個体の血清と白血球を保存し、それぞれの移植細胞に対する抗体の発現と CD4 と CD8 陽性細胞の割合をフローサイトメーターで検討した。

結果：網膜下でも in vitro と同程度に目的遺伝子は発現していた。BDNF は MHC-I や -II 遺伝子の発現を up-regulation しないが、Axokine は少なくとも MHC-I 発現を誘発した。また、Axokine 導入細胞移植後の血清は Axokine 導入細胞に対して抗体反応が見られた。移植後 1 週間で CD8 細胞の比が他細胞移植に比較して増大傾向があった。

結論：神経保護因子を利用する際には、神経保護以外のそれぞれの因子特有の作用に注意すべきである。

Purpose: Local and systemic reaction after neurotrophic factor-gene transfected cell transplantation.

Methods: We performed somatic cell transplantation expressing Axokine, bFGF, and BDNF with EGFP.

After transplantation into rat subretinal space, these cells were recovered by cell sorter and examined each gene expression as well as MHC-I and -II by real-time PCR. Each rat serum and leukocytes were collected and examined the reaction against transplanted cells and the proportion of CD8 + / CD4 + T cells.

Results: Each gene was expressed in the subretinal space as that of in vitro. Axokine was suspected to enhance the MHC-I expression whereas BDNF not. Statistically significant serums reaction was observed after Axokine transplantation. CD8 + / CD4 + proportion tended to be higher in Axokine transplantation.

Conclusion: Neurotrophic factors should be regarded as having its factor specific function.

キーワード：神経保護因子、移植、抗体反応、MHC-I、MHC-II、BDNF、Axokine

緒言

網膜色素変性や加齢黄斑変性などの難治性網膜疾患はまだ確立された治療法がない。病態についても不明なものが多い。いったん発症すると患者の生活の質は著しく障害される。まだ、臨床結果を評価できる段階ではないものの、難治性網膜疾患の代表である網膜色素変性^{1)、2)}加齢黄斑変性 (AMD)^{3)、4)} に対して、細胞移植を利用した再生医療の試みが行われてきた。我々が AMD に行ってきた、脈絡膜新生血管除去後に自己の培養虹彩色素上皮細胞 (IPE) を移植する方法は¹⁾、CNV 除去後に障害された網膜色素上皮 (retinal

pigment epithelium, RPE) の代用細胞となることを目的とした。結果は既報のとうりで⁵⁾、移植細胞によると思われる拒絶反応はみられず、また移植細胞の眼内での増殖は見られなかった。移植による合併症はないと考えられた。

我々はこの細胞移植を利用して他の難治性網膜疾患に細胞移植による治療の適応があるかを検討してきた。今回は移植細胞に神経保護因子遺伝子を導入し、局所あるいは全身の反応について検討した。

方法

培養細胞への遺伝子導入

培養細胞に導入する遺伝子のうち、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) cDNA は東北大学神経内科武田篤先生から提供された。Axokine cDNA は住友製薬株式会社から提供された。それぞれの cDNA は抗カナマイシン遺伝子を発現する pIRES2-EGFP ベクター (IRES2 ベクター) (Clontech; California, 米国) か抗 zeocin 耐性遺伝子を発現する pcDNA4 / HisMax TOPO[®] TE Expression ベクター (Topo ベクター) (Invitrogen; California, 米国) に組み込んだ。IRES2 ベクターはさらに internal ribosomal entry site (IRES) を持ち、目的遺伝子と同時に蛍光色素である enhanced green fluorescein protein (EGFP) を発現するように調整されている。どちらのベクターも lipofection 法 (Gibco BRL) を用いて、ラット培養 RPE 細胞に導入した。これらの細胞は培養と継代を繰り返しても導入遺伝子の発現があることを確認した。

RNA の抽出と reverse-transcriptase (RT)-PCR

mRNAs は oligo dT cellulose を用いて抽出した。Real-time PCR はマニュアルに従って行った。すなわち、PCR 産物は Green I dye (BMA, Rockland, ME) で染色し、fluorescein-detectable specific thermal cycler (Smart Cycler; TaKaRa, Kyoto,) で定量した。

ラットへの移植

ラットへの移植に用いた細胞は移植直前にトリプシン処理により培養皿から回収し、HBSS で 2 回洗浄後に使用した。移植は生後 6 ~ 8 週の雄 SD ラットを pentobarbital sodium (60mg/kg) と atropine (0.4mg/kg) で麻酔した後に、20,000/μl、2 μl 合計 4 万個の細胞を含む HBSS 液を赤道部を中心に網膜下腔に注入した。対照として同じ量の HBSS を同じ領域の網膜下腔に注入した。

移植網膜のパパイン処理とセルソーティング

移植を受けたラット網膜は前眼部を除去後にパパイン処理 (20unit/ml) し、遠心して細胞を回収した。EGFP の蛍光を発現する移植細胞はフローサイトメータ (FACSCalibur HG フローサイトメータ、日本ベクトン・デッキンソン株式会社) で回収した。

移植細胞に対する抗体 (血清中の抗 RPE 抗体の検出)

細胞を移植されたラットの血清中に存在する抗 RPE 抗体の出現をフローサイトメータ (FACS) を利用して検出を試みた。それぞれの移植細胞に各ラットの血清を反応させ、phycoerythrin (PE) でラベルした抗ラット IgG 抗体でさらに反応させた (10 μl/10⁶ cells)。それぞれの反応液はフローサイトメータで解析した。

結果

それぞれの RPE にベクターや各種細胞増殖因子が導入された細胞は EGFP の蛍光で確認できた (図 1)。それぞれのサイトカインが導入された場合は ELISA、RT-PCR、real-time PCR のいずれかあるいは組み合わせでその発現量を確認した。Axokine と BDNF を導入した場合の濃度はそれぞれ 373 と 90 pg/mg 蛋白質であった。

それぞれの神経栄養因子を導入した後に各細胞の MHC-I と -II 遺伝子発現を real-time PCR で比較してみると Axokine の導入は MHC-I の発現を誘発する可能性が示唆された (図 2)。

移植細胞をフローサイトメータで回収して、網膜下での目的遺伝子の発現を real-time PCR で確認したところ、通常の培養皿に培養している状態とほぼ同様の目的遺伝子の発現があることが確認できた。

移植後のラット血清を保存し、移植細胞に対する抗体反応を検討したところ、Axokine 導入細胞を移植されたラットの血清は Axokine 導入細胞に対して他の細胞よりも有意に多く抗体反応を

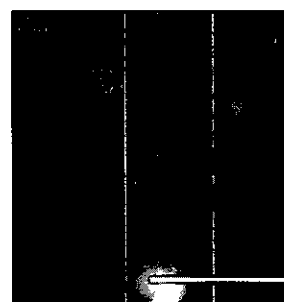


図 1 EGFP を発現する細胞は抗生物質で選択した。バーは 50 μm。

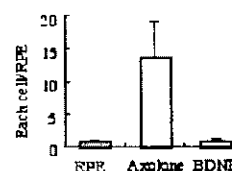


図 2 Axokine は MHC-I 発現を誘発する可能性が示唆される。

示すことが示唆された。

CD8 陽性細胞と CD4 陽性細胞の比は有意差はないものの、Axokine 導入細胞で他の細胞よりも CD8 陽性細胞が多い蛍光があった。

考 察

自己の IPE であれば培養しても安全に網膜下に移植できることが判明したことにより、これまで臨床応用されなかった、遺伝子を利用した難治性網膜疾患の治療にも利用できる可能性を考え検討した。BDNF は同種の細胞に導入されれば、局所の炎症の誘発はないと考えられ、また、全身的にも移植細胞に対する抗体反応はみられない。しかし、すべての神経保護因子にあてはまるものではなく、Axokine は局所的にも全身的にも免疫反応を誘発する可能性があることが判明した。

我々のこれまでの検討では、神経保護因子導入細胞移植は光障害の実験では統計学的に有意に視細胞を保護することも判明しているが、今後は副作用を含めた多方面からの詳細な検討が必要であると思われる。

文 献

- 1) Radtke ND, Aramant RB, Seiler M, Petry HM. Preliminary report: indications of improved visual function after retinal sheet transplantation in retinitis pigmentosa patients. *American Journal of Ophthalmology*. 1999; 128: 384-387.
- 2) Humayun MS, de Juan E, Jr., del Cerro M, et al. Human neural retinal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 3100-3106.
- 3) Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y, Kopp ED. Transplantation of RPE in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. *Graefes Archive for Clinical & Experimental Ophthalmology*. 1997; 235: 149-158.
- 4) Abe T, Yoshida M, Tomita H, et al. Functional analysis after auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration. *Tohoku J Exp Med*. 1999; 189: 295-305.
- 5) 阿部俊明・他：眼の再生医学、色素上皮細胞を利用した網膜再生医療の可能性。日本眼科学会雑誌106：778-804，2002.

網膜虚血再還流障害においてミューラー細胞特異的に発現する ヘムオキシゲナーゼ-1の解析

To investigate the function of heme oxygenase-1 that expressed only in Muller cells after retinal ischemia-reperfusion injury.

片井直達、新井郷子、吉村長久
信州大学医学部眼科学講座

Naomichi Katai, Satoko Arai, Nagahisa Yoshimura
Shinshu University School of Medicine, Department of Ophthalmology

目的；虚血再還流障害網膜において、DNA マイクロアレイにより遺伝子の発現変動を解析したところ、機能の相反する2種の遺伝子群が発現することを明らかになった。すなわち、一方は細胞死に関与する遺伝子群であり、もう一方は、細胞死を阻害する遺伝子群である。我々は後者、その中でもミューラー細胞特異的に発現するヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) に注目し、網膜障害における機能の解析を行った。

方法；SD ラットの前房内に27ゲージ針を刺入し前房圧を110mmHg に上げる圧付加法により網膜虚血を行った。45分、60分虚血の後再還流させた。HO-1 の発現を遺伝子レベル、タンパク質レベルで検討した。免疫染色によりHO-1 の局在を明らかにした。腹腔内にヘムオキシゲナーゼ阻害剤を投与し、24時間後に眼球を採取した。また、遺伝子導入により HO-1 の発現を特異的に阻害した。組織標本の TUNEL 染色により死細胞数の変化を検討した。ミューラー細胞を免疫染色し細胞数を比較した。

結果；HO-1 の発現は、再還流後3時間より増加し12-24時間でピークを迎えた。HO-1 は免疫染色よりミューラー細胞特異的に発現していた。阻害剤投与により、内顆粒層、外顆粒層における TUNEL 陽性細胞数が有意に増加した。また、ミューラー細胞数の減少を認めた。遺伝子導入により、再還流後24時間での HO-1 の発現が阻害された。組織学的に、ミューラー細胞の消失と、網膜の破壊的障害を認めた。コントロール眼には正常眼との有意差を認めなかった。

結論；網膜虚血再還流障害時ミューラー細胞に高発現する HO-1 は、ミューラー細胞の生存に必須であった。ミューラー細胞が消失した網膜は破壊的に傷害されていた。これより、再還流障害時には、ミューラー細胞の網膜保護作用が非常に重要と考えられた。網膜虚血再還流障害時にはミューラー細胞はほとんど傷害されないが、その理由は HO-1 が速やかに発現し、防御効果を示すためと考えた。

Purpose: The gene expression profile were previously screened in retinal ischemia reperfusion injury by using the DNA microarray system and two opposite functional gene groups were expressed in injured retina. One is the cell death promoting genes expressing in dying retinal neurons and another is the cell death protecting genes in surviving cells. We focused on the latter one, especially HO-1. Our purpose is to characterize the Heme oxygenase-1 (HO-1) induced in Muller cells after ischemia reperfusion injury. Methods: Transient retinal ischemia for 45-60 minutes was performed to male Sprague-Dawley rats (200-300g) by increasing the intraocular pressure. Retinas were collected at various time points after reperfusion, and both protein and gene expression levels were measured by using Western blotting and real-time RT-PCR methods, respectively. Localization of HO-1 proteins in injured retina was determined using the immunohistochemical methods. To clarify the function of HO-1 in ischemic injured retina, the inhibitors of HO-1 were applied. Results: On Western blotting, HO-1 was induced in injured retina from 6 to 48 hours after ischemic insult but not in sham operated retina. HO-1 gene expression level was gradually increased after the injury and the peak time point was at 12 hour after the ischemic insult. HO-1 was expressed only in Muller cells. Neuronal cells were not stained with anti-HO-1 antibody. After the treatment of HO-1 inhibitors, HO-1 expression was totally blocked. Muller cells were completely disappeared in some areas. In these areas, the architecture of retina was disrupted. Conclusions: HO-1 was only expressed in the Muller cell after the ischemia reperfusion injury. HO-1 was essentially needed for the survival of Muller cells in the ischemic retinal injury.

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ-1、網膜虚血再還流障害、ミューラー細胞、神経保護

Key Words . Heme oxygenase-1, retinal ischemia reperfusion injury, Muller cell, neuroprotection

研究の背景と目的

われわれは、網膜虚血再還流障害ラットモデルを使い、障害時の網膜の挙動について研究してきた。その中で、網膜神経細胞は自らを積極的に死に導くアポトーシスと言う系を使い自らの数を減らすことで網膜全体の神経経路ネットワークを保つことを明らかにした。しかし、一つ一つの候補遺伝子を次々に解析することは非常に労力にいたる仕事であるため、最近盛んに行われるようになった DNA microarray system を使い、この障害時に変化のある遺伝子をスクリーニングした。その結果障害下網膜には、機能の相反する2種の遺伝子群が発現することが明らかになった。すなわち、一方は細胞死に関与する遺伝子群であり、もう一方は、細胞死を阻害する遺伝子群である。我々は後者、その中でもミユラー細胞特異的に発現するヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) に注目し、網膜障害における機能の解析を行った。

方法

SD ラットの前房内に27ゲージ針を刺入し前房圧を110mmHg に上げる圧付加法により網膜虚血を行った。45分、60分虚血の後再還流させた。3、6、12、24、48時間後に眼球を採取し解析を行った。腹腔内に、ヘミンまたはヘムオキシゲナーゼ阻害剤を投与し、その後45-60分の網膜虚血を行い24時間後に眼球を採取した。再還流後30日目における網膜厚を測定比較した。また、遺伝子導入法により HO-1 の発現を特異的に阻害した。組織標本の TUNEL 染色により死細胞数の変化を検討した。ミユラー細胞を s-100 により免疫染色し細胞数を比較した。

結果

ヘムオキシゲナーゼの基質であるヘミン投与により、網膜内顆粒層、外顆粒層における TUNEL 染色陽性細胞数の有意な減少を認めた。28日目における網膜厚は、ヘミン投与により有意に増加した。阻害剤投与により、内顆粒層、外顆粒層における TUNEL 陽性細胞数が有意に増加した。また、ミユラー細胞数は、正常網膜と虚血再還流後網膜間には有意な差はなかったが、阻害剤投与群との間には有意な減少を認めた。遺伝子導入により、再還流後24時間での HO-1 の発現が完全に阻害されたことが、免疫染色、ウエスタンブロッティングから明らかになった。組織学的に、ミユラー細胞の消失と、網膜の破壊的障害を認めた。コントロール眼には正常眼との有意差を認めなかった。

考案

網膜虚血再還流障害時ミユラー細胞に高発現する HO-1 は、ミユラー細胞の生存に必須であった。ミユラー細胞が消失した網膜は破壊的に傷害されていた。これより、再還流障害時には、ミユラー細胞の網膜保護作用が非常に重要と考えられた。網膜虚血再還流障害時にはミユラー細胞はほとんど傷害されないが、その理由は HO-1 が速やかに発現し、防御効果を示すためと考えた。

Mitogen-activated-protein-kinase (MAPK) の Müller 細胞における役割

The function of Mitogen-activated-protein-kinase (MAPK) in the Müller cell.

中澤 徹、玉井 信

東北大学大学院医学系研究科感覚器病態学講座眼科学分野

Toru Nakazawa, Makoto Tamai

Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

【抄録】

Mitogen-activated-protein-kinase (MAPK) の Müller細胞における役割を探るために、虚血再灌流モデル、および成熟ラット視神経切断モデルを用いて検討した。網膜虚血再灌流モデルや視神経切断時に脳由来神経栄養因子 (BDNF) の硝子体投与で、MAPK のリン酸化が Müller細胞に特異的に認められることを見いだした。更に、MAPK の特異的抑制物質を使用し、Müller細胞での MAPK のリン酸化を抑制すると、虚血再灌流モデルでは網膜神経節細胞死が増強し、視神経切断における BDNF の硝子体投与では、BDNF の持つ神経保護作用が減少した。つまり、Müller細胞での MAPK の活性化はどちらの動物実験モデルにおいても、神経保護的に働いていたことが証明された。

In order to explore the function of Mitogen-activated-protein-kinase (MAPK) in the retinal Müller cells, we utilized ischemia-reperfusion injury model or optic nerve axotomy model. We found the phosphorylation of MAPK in the retinal Müller cells following ischemia-reperfusion injury and axotomy with intravitreal injection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The inhibition of MAPK pathway by specific inhibitors, U0126, increased the retinal ganglion cell death after ischemia-reperfusion injury and decreased the BDNF-induced neuroprotective effects in the axotomized retinal ganglion cells. These results indicated that activation of MAPK pathway in the retinal Müller cell played the neuroprotective role against retinal injury.

キーワード：虚血再灌流障害、BDNF、MAPK、細胞内シグナル伝達、網膜神経節細胞、細胞死

抄 録

MAPK (Erk) の網膜における働きはあまりよく分かっていない。これまでの培養神経細胞での報告では、MAPK カスケード (Ras-Raf-Erk-Elk) はリン酸化によりシグナル伝達が行われていることや、MAPK (Erk) の活性化により Elk が核内移行し転写促進され、c-fos の発現が亢進し、神経細胞の様々な反応 (分化・増殖) に関与することなどが知られている。

Müller細胞は網膜を縦走る網膜内の主要なグリア細胞で、グルタミン酸の取り込みをはじめ、網膜細胞にとって生存や機能維持に重要な働きをしていることが知られている。しかし詳細な分子機構は不明な点が多い。そこで今回我々は、2つの障害モデルを用いて、特異的な MAPK インヒビターで MAPK 経路を抑制した時の、網膜神経節細胞の生死に関わる変化を検討した。

方 法

成熟 SD ラット10から12週齢の雄を使用した。網膜神経節細胞を標識するために、手術7日前、上丘に逆行性色素フルオロゴールドを留置した。視神経切断モデルは、ネンブタール腹腔麻酔後、中心動脈を損傷しないように視神経を完全に切断した。同時に BDNF または基材を硝子体中に投与した。術後10日目に網膜進展標本作製し、一定面積の生存している網膜神経節細胞を計測した。網膜虚血再灌流モデルは、視神経を鞘ごとクリッピングし、網膜虚血を確認後1時間経過したところで、クリップを外し再灌流させた、術後7日後に進展標本にて計測した。MAPK の障害における役割を見るために、MAPK 特異的インヒビターを硝子体中に投与し、生存細胞を計測することにより評価した。

結 果

視神経切断により、網膜神経節細胞は細胞死を起し、切断10日後には約20%しか生存していないが、同時にBDNFを投与すると、約80%が生存していた。リン酸化MAPKを特異的に認識する抗体を用いて免疫染色を行うと、BDNFを投与により、主にMüller細胞にMAPKのリン酸化を強く認めた。MAPK特異的インヒビターであるU0126を前投与すると、網膜内でMAPKのリン酸化は減少し、生存細胞数も有意に減少した。網膜虚血再灌流モデルでは、再灌流1時間後よりMüller細胞にMAPKのリン酸化を強く認めた。U0126投与により、MAPKのリン酸化は減少し、生存細胞数も基質投与群と比較して有意に減少した。

考 察

今回の検討で、障害に対するMAPKのリン酸化は主にMüller細胞に認め、その時間経過も1時間と短い時間で認められた。MAPK特異的インヒビターであるU0126を前投与すると、網膜内でMAPKのリン酸化は減少し、生存細胞数も有意に減少したことから、このMüller細胞でのMAPKのリン酸化は、障害に対する網膜神経節細胞の生存維持に間接的に働きかけていることが示された。これまでに虚血再灌流障害時にMüller細胞での遺伝子発現変化が報告されている、神経保護分子としてはBDNF、bFGF、CNTFなどが報告され、逆に細胞死促進因子として一酸化窒素産生酵素(NOS)の報告もある、MAPK経路は最終的に転写に関わりこのような分子の発現に関与していると考えられる。本研究の成果は、Müller細胞を介した間接的な細胞保護作用を目指す足がかりになると思われ、Müller細胞の網膜全層に伸びる解剖学的な特徴から、視細胞を含めた広範な網膜神経細胞の保護に繋がる可能性を秘めている。今後、更に詳細な分子機構を解明することが必要であると考えられる。

文 献

- 1) Akiyama H, Nakazawa T, Shimura M, Tomita H, Tamai M. Presence of mitogen-activated protein kinase in retinal Muller cells and its neuroprotective effect ischemia-reperfusion injury. *Neuroreport*. 2002; 13: 2103-7.
- 2) Nakazawa T, Tamai M, Mori M. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death

through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43: 3319-26.

高分子強膜内インプラントによる後眼部への薬物デリバリー

Polymeric intrascleral implant for drug delivery to the posterior segment of the eye

岡部高明、木村英也、岡部純子、加藤亜紀、久納紀之、野崎実穂、小椋祐一郎
名古屋市立大大学院視覚科学

Komei Okabe, Hideya Kimura, Junko Okabe, Aki Kato, Noriyuki Kunou, Miho Nozaki, Yuichiro Ogura
Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School

【抄録】

【目的】 ベタメサゾン (BM) 含有強膜内インプラントを調製し、眼内動態及び安全性について評価した。

【方法】 エチレン酢酸ビニル共重合体を用いて、BM の長期 0 次溶出が可能な膜溶出制御型インプラントを調製した。これを家兎強膜内へ移植し、移植後経時的に眼球を摘出し、眼組織中の BM 濃度を測定した。また、異なる 3 箇所の網脈絡膜中 BM 濃度も測定した。安全性の評価として ERG および病理学的検討を実施した。

【結果】 インプラントからの BM 溶出挙動は *in vitro*、*in vivo* において約 4 週間 0 次溶出を示した。BM は硝子体、網脈絡膜組織へ移行し、網脈絡膜においては約 4 週間炎症抑制を目的とする薬物有効濃度を維持した。網脈絡膜中 BM 濃度は検討期間を通して濃度勾配が認められた。ERG、組織学的には明らかな網膜毒性は認められなかった。

【結論】 高分子強膜内インプラントは後眼部に対する新しい薬物送達システムとして今後期待できると考えられた。

Purpose: To evaluate the tissue distribution of betamethasone (BM) after implantation of a non-biodegradable polymeric intrascleral implant as a new controlled intraocular delivery system.

Methods: Intrascleral implants designed to release BM for at least 1 month were placed in the sclera of pigmented rabbits. The BM concentrations in the aqueous humor, vitreous, and retina/choroid were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) at weeks 1, 2, and 4 after implantation. The BM concentrations in three sections of retina/choroid were also investigated. Retinal toxicity was evaluated by electroretinography and histological examination.

Results: The BM release from the intrascleral implant *in vitro* and *in vivo* showed zero-ordered release profiles for 4 weeks. The BM concentrations in the retina/choroid after implantation of the intrascleral device remained higher than the effective concentrations for suppressing various inflammatory processes for at least 4 weeks. The BM concentrations in the retina/choroid around the implantation site were over 10 times higher than in the opposite side and the posterior pole throughout the study. No substantial toxic reactions were observed by electroretinography or histologic study.

Conclusion: These findings suggested that the polymeric intrascleral implant could be a useful drug carrier for intraocular delivery of BM without producing severe retinal toxicity. The implantation site might be determined in consideration of the intraocular drug distribution after implantation.

キーワード：強膜内インプラント、生体非分解性高分子、コルチコステロイド、分布、ベタメサゾン

Key Words: intrascleral implant, non-biodegradable polymer, corticosteroid, distribution, betamethasone

緒言

網膜硝子体疾患に対する薬物療法において問題となるのは薬物の眼内移行性である。点眼では後眼部への薬物移行が難しく、全身投与においては治療効果を得るために大量投与が必要になることがしばしばあり副作用が問題になる。直接的な方法として、薬物の硝子体注入があるが、頻回の投与が必要となる場合が多く、硝子体出血や網膜剥離などの合併症の危険性が高くなる。このような

問題を解決するためには眼内への薬物徐放システムの開発が必要であろう。

最近、薬物送達のターゲットとして強膜が注目されている。強膜は、構造的には角膜実質と類似しており、眼球において最も大きい表面積を有している。強膜内に持続的に薬物を投与した場合、分子量依存性に高分子量の薬物も、脈絡膜、色素上皮、網膜を通過して、硝子体内まで通過できることが報告されている^{1), 2)}。これまでに、本研

研究室においても生分解性高分子を用いたステロイド含有強膜内インプラントについて報告した³⁾。生体非分解性高分子は、眼科領域においてすでに硝子体内や、結膜嚢挿入剤として臨床応用されている。本高分子を用いて調製したインプラントは、薬物溶出制御が容易であり、より長期間の0次溶出が可能であることが知られている^{1)~7)}。そこで今回ステロイドを徐放する膜溶出制御型高分子インプラントを家兎眼の強膜内に埋め込み、網膜硝子体組織への薬物移行を評価した。合わせて標的組織のひとつである網脈絡膜中のBM濃度分布についても検討した。

方法

BMと水溶性高分子であるポリビニルアルコールとをBM含量が75%となるように混合し、塗付、乾燥、切断の過程を経て直径4mm、厚さ1mmのペレットを調製した。本ペレットの片面には薬物不透過膜として生体非分解性高分子であるエチレン酢酸ビニル共重合体(EVA:33%酢酸ビニル含有)を加熱、溶融し圧着した。次に2.5% EVA/dichloromethane 溶液に5s浸漬することによって溶出制御膜を作製した。その後、有機溶剤除去のため減圧乾燥をおこない、強膜内インプラントとした(図1)。



図1 強膜内インプラント

In vitro 溶出試験は50mLのリン酸緩衝液(phosphate buffered saline: PBS)とインプラントを密閉容器にいれ、37°Cにて緩やかに振とうした。溶出液は経時的に採取し、新鮮なものと置換した。BM濃度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。

強膜内インプラントの移植は以下の手順で実施した。家兎結膜を切開し強膜露出後、メス、クレセントナイフを用いて強膜ポケットを作製した。次にインプラントをポケットに挿入後、強膜創および結膜を7-0シルク糸にて1針ずつ縫合した。

眼組織中BM濃度の測定は3、7、14及び28日後に眼球を摘出し、硝子体および異なる3箇所における網脈絡膜中のBM濃度をHPLCで測定した。また、移植28日後には網脈絡膜の切片を作製し組織学的評価と、正常眼である対側眼とのb波の振幅を比較することによってERG評価も実

施した。

結果

in vitro および in vivo とともにインプラントからのBMの溶出挙動は約4週間0次溶出を示した(図2)。

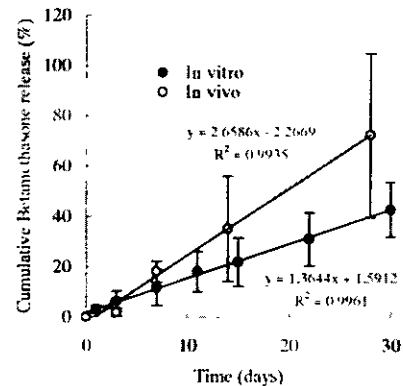


図2 In vitro 及び in vivo における薬物放出挙動

眼組織においては検討期間を通して硝子体、網脈絡膜ともにBMの移行が認められた。また網脈絡膜組織では約4週間炎症抑制に対する有効濃度を維持した(図3)。網脈絡膜中のBM濃度分

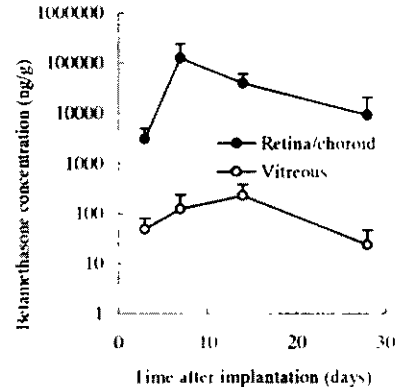


図3 強膜内インプラント移植後の硝子体、網脈絡膜中BM濃度

布は、検討期間を通して濃度勾配が認められた。移植14日後においては、移植部位周辺とその他の部分において有意な濃度差が認められた(図4)。

組織性学的評価においては移植28日後の移植部位の網膜には顕著な変化はみられなかった(図5)。また、ERGにおいてはインプラント移植後28日後においても非治療眼である対側眼とのb波の振幅の比は1前後の値を示しており、網膜において顕著な毒性は認められなかった。

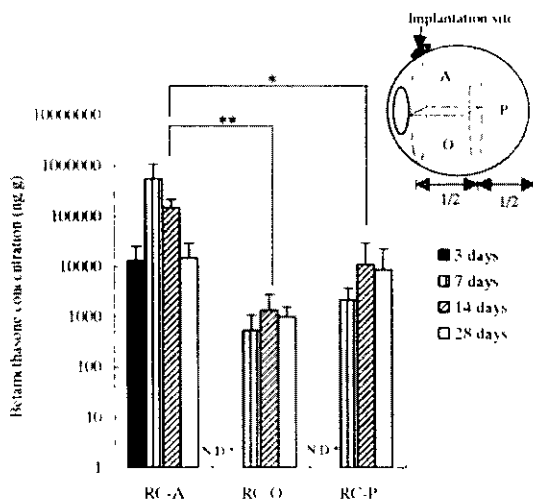


図4 網脈絡膜中 BM 濃度分布 (RC-A : 移植部位周辺、RC-O : 移植部位の対側、RC-P : 後極部)

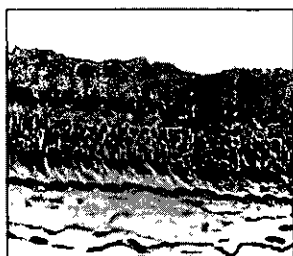


図5 移植12週後の移植部位周辺網膜の光学顕微鏡写真。網膜は正常な層構造を維持していた

考察

生体非分解性高分子を用いて調製した強膜内インプラントから BM は *in vitro* および *in vivo* に於いて 4 週間 0 次溶出をせしめ、網脈絡膜組織で約 4 週間有効濃度を維持することができた。脈絡膜と網膜の間には血液網膜関門である網膜色素上皮があり、多くの物質の通過がここで遮断されるが、脂溶性物質は細胞内を透過することができたため比較的高濃度の薬物が透過可能であるとされている⁸⁾。BM は比較的脂溶性の低分子量薬物である (分子量 : 516)。したがってインプラントから溶出した BM は細胞間の単純拡散により通過したと考えられた。また、今回網脈絡膜中には検討期間を通して BM の濃度勾配がみとめられ、その濃度は移植部位からの距離に依存していた。この結果は、経強膜的に薬物を網脈絡膜の病変部位まで送達させる場合には、移植部位が重要であることが示唆された。

我々は今までに、硝子体手術の際に使用する強膜プラグに類似した形状で、毛様体扁平部に固定

し硝子体腔に薬物を徐放する形の生体分解性インプラントを開発し、網膜硝子体組織への薬物送達システムとしての有用性に関して報告してきた^{9)~16)}。プラグ型のインプラントは薬物放出後期に高分子の崩壊に伴い硝子体刺入部で切断され、硝子体腔に一部脱落する可能性も考えられるが、強膜内に移植する場合その危険は回避できる。網脈絡膜や硝子体などの眼内組織への影響も少ないことから、より低侵襲な方法といえる。これまでにわれわれは生分解性高分子を用いた強膜内インプラントについて報告を行なったが¹⁾、今回、基材を生体非分解性とすることによって Core-shell 構造を持つインプラントの調製が可能となった。本構造を有するインプラントはより容易な薬物溶出制御が可能であり、また比較的長期間のリリースも可能である^{4)~7)}。このことから将来的には、比較的不安定な生理活性蛋白などへの適用も可能であると考えられる。また、眼圧上昇などの不都合が生じた場合には比較的容易に除去することができる。

組織学および ERG においても網膜に顕著な毒性はみとめられなかった。

以上より、この強膜内インプラントは後眼部に対する新しい薬物送達システムとして今後期待できると考えられた。

文献

- 1) Ambati J, Canakis CS, Miller JW, et al. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1181-1185, 2000
- 2) Ambati J, Graroudas ES, Miller JW, You TT, Miyamoto K, Delori FC, Adamis AP: Transscleral delivery of bioactive protein to the choroid and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1186-1191, 2000
- 3) Okabe J, Kimura H, Kunou N, Okabe K, Kato A, Ogura Y. Biodegradable intrascleral implant for sustained intraocular delivery of betamethasone phosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
- 4) Sanborn GE, Anand R, Torti RE, et al. Sustained-release ganciclovir therapy for treatment of cytomegalovirus retinitis. *Arch Ophthalmol* 110: 188-195, 1992
- 5) Smith TJ, Pearson PA, Blandford DL, et al. Intravitreal sustained-release ganciclovir. *Arch Ophthalmol*, 110: 255-258, 1992

- 6) Guembel HO, Krieglsteiner S, Rosenkranz C, et al. Complications after implantation of intraocular devices in patients with cytomegalovirus retinitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 237: 824-829, 1999
- 7) Mochizuki M, Ikeda E, Yoshimura K, et al. Treatment of cytomegalovirus retinitis in AIDS with an intraocular sustained-release ganciclovir implant. *J Jpn Ophthalmol Soc*, 102: 515-521, 1998
- 8) Cunha-Vaz J: The blood-ocular barriers, review. *Surv Ophthalmol* 23: 279-296, 1979.
- 9) Kunou N, Ogura Y, Hashizoe M, Honda Y, Hyon SH, Ikada Y: Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits. *Controlled Release* 37: 143-150, 1995
- 10) Hashizoe M, Ogura Y, Kimura H, Moritera T, Honda Y, Kyo M, Hyon SH, Ikada Y: Scleral plug of biodegradable polymers for controlled drug release in the vitreous. *Arch Ophthalmol* 112: 1380-1384, 1994
- 11) Hashizoe M, Ogura Y, Takanashi T, Kunou N, Honda Y, Ikada Y: Implantable biodegradable polymeric device in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res* 14: 473-477, 1995
- 12) Hashizoe M, Ogura Y, Takanashi T, Kunou N, Honda Y, Ikada Y: Biodegradable polymeric device for sustained intravitreal release of ganciclovir in rabbits. *Curr Eye Res* 16: 633-639, 1997
- 13) Miyamoto H, Ogura Y, Hashizoe M, Kunou N, Honda Y, Ikada Y: Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of fluconazole. *Curr Eye Res* 16: 930-935, 1997
- 14) Yasukawa T, Kimura H, Kunou N, Miyamoto H, Honda Y, Ogura Y, Ikada Y: Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of ganciclovir. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 186-190, 2000
- 15) Kunou N, Ogura Y, Yasukawa T, Kimura H, Miyamoto H, Honda Y, Ikada Y: Long-term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of cytomegalovirus retinitis. *J Control Rel* 68: 263-271, 2000
- 16) Kunou N, Ogura Y, Honda Y, Hyon SH, Ikada Y: Biodegradable scleral implant for controlled intraocular delivery of betamethasone phosphate. *J Biomed Mater Res*: 51: 635-641, 2000

網膜色素変性患者における GCAP2 遺伝子異常の検索

Mutation analysis in the GCAP2 gene with retinitis pigmentosa

佐藤元哉、柳橋さつき、中沢 満
弘前大学医学部眼科

Motoya Sato, Satsuki Yanagihashi, Mitsuru Nakazawa
Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

【抄録】

常染色体優性網膜色素変性 (ADRP) 63家系、常染色体劣性網膜色素変性 (ARRP) 33家系を対象とし、GCAP2 (guanylate cyclase activating protein2) 遺伝子の異常の有無について検索し、遺伝子変異と網膜変性の関連を検討した。その結果、ADRP の患者 3名においてこれまでに報告のないミスセンス変異 Gly157Arg が検出され、このアミノ酸置換は正常者50人で認められなかった。また2家系において家系調査を行ったところ、同変異をもつ網膜色素変性4例、黄斑変性1例、正常表現型1例がみられ、浸透度の多様性をもつ変異である可能性が示唆された。

We screened the GCAP2 (guanylate cyclase activating protein2) gene and analyzed genotype-phenotype correlation in 63 patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) and 33 patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa (ARRP).

In three patients with ADRP, a GGA to AGA change at codon 157 was identified. This change was not seen in 50 unrelated normal subjects. As a result of ophthalmological examination in members with the mutation in this gene, four patients with retinitis pigmentosa, one patient with macular degeneration, and one patient with asymptomatic normal phenotype were clinically observed. It is suggested that the mutation in the GCAP2 gene may cause variable phenotypic expression.

キーワード：GCAP、グアニレートサイクレス、網膜色素変性症、浸透率
Key Words : GCAP, guanylate cyclase, retinitis pigmentosa, penetrance

はじめに

網膜視細胞の光情報伝達機構において、グアニレートサイクレスは細胞内 cGMP 濃度を保つ働きをしているが、このグアニレートサイクレスをカルシウム濃度依存的に制御しているのが GCAP (guanylate cyclase activating protein) と呼ばれるタンパクであり、これまでにヒトの網膜において3種類が同定されている。GCAP はカルシウム結合タンパク superfamily に属し、EF-hand motif と呼ばれるカルシウム結合領域を3つ持っている。また、GCAP1 は錐体優勢に、GCAP2 は桿体優勢に発現しており、以上のことから、GCAP1 遺伝子の異常では錐体ジストロフィーが、GCAP2 遺伝子の異常では網膜色素変性が生じることが予想される。実際に GCAP1 については、1998年、イギリスの常染色体優性錐体ジストロフィーの1家系において、GCAP1 遺伝子のミスセンス変異がはじめて報告され¹⁾、これまでに合計3種のミスセンス変異が報告されている。一方、GCAP2 については変異の報告はない。そこで、今回日本人の網膜色素変性患者における

GCAP2 遺伝子の異常の有無について検索し、遺伝子変異と網膜変性の関連を検討した。

対象と方法

対象は、弘前大学眼科に登録されている常染色体優性網膜色素変性 (以下、ADRP) 63家系、常染色体劣性網膜色素変性 (以下、ARRP) 33家系とした。

方法は、末梢血白血球より DNA を抽出、GCAP2 の4つの exon を PCR (polymelase chain reaction) 法にて増幅、SSCP 法、heteroduplex 法にてスクリーニングを行い、異常なバンドの検出された症例では直接塩基配列決定を行った。コントロールとして、正常者50人での検討も行った。変異のみられた症例では、眼科的検査と家系調査を可及的に行った。

結果

ADRP の exon1、2、4、ARRP の exon1 において多型と考えられる変化を認めた。また、ADRP の exon3 においては、コドン157番目の

グリシンがアルギニンに変わる変化が3家系に認められ、正常者50人において認められなかった。(表1)そこで、exon 3の変異を認めた3家系に

	exon	nucleotide change	frequency in patients
ADRP	1	TAT57TAC (Y57)	12
	2	ACC87ATC (T87I)	1
	3	GGA157AGA (G157R)	3
	4	CTG180CTA (L180L)	1
ARRP	1	TAT57TAC (Y57Y)	9
		GTG29GTA (V29V)	2
	2	0	
	3	0	
	4	0	

表1 GCAP2 遺伝子解析の結果

ついて可及的に家系調査を行った。

1家系目では、網膜色素変性を示した症例は全員変異を持ち、さらに黄斑変性を持つ症例にも同じ変異を認めた。2家系目では、発端者に変異を認めたが、正常な母親にも同じ変異を認めた。3家系目では現在のところ、発端者のみしか調べられていないが、遺伝形式は優性遺伝を示すことが示唆された。

考案

1999年、Payneら²⁾はADRP 400家系を対象にGCAP2 遺伝子異常の有無を検索した結果、いくつかの多型を認めたものの、明らかな変異は認められなかったと報告した。今回の我々の調査では、ADRP 63家系中3家系において、GCAP2 exon3 のミスセンス変異と考えられる変化を検出した。この変化はPayneらの報告にはないものであり、さらに正常者50人において検出されなかった。

今回、異常が検出されたコドン157はEF-hand motifをつかさどる部位であり、この変異によりカルシウムと結合できなくなると考えられる。このため、GCAP2の機能障害をきたし、浸透率が低いADRPの病因となっている可能性があるかと推察された。今後は、in vitroでの発現実験や動物実験でさらに検討する必要があると考えられた。

文献

1) Payne AM, Downes SM, Bessant DAR, et al: A mutation in guanylate cyclase activator 1A (GUCA1A) in an autosomal dominant cone dystrophy pedigree

mapping to a new locus on chromosome 6p21. 1. Hum Mol Genet 7: 273-277, 1998.
2) Payne AM, Downes SM, Bessant DAR, et al: Genetic analysis of the guanylate cyclase activator 1B (GUCA1B) gene in patients with autosomal dominant retinal dystrophies. J Med Genet 36: 691-693, 1999.

IMPDH1 遺伝子異常の解析および臨床像の検討

— 人種差による変異の違いについて —

MUTATION SURVEY OF THE IMPDH1 GENE IN PATIENTS WITH
AUTOSOMAL DOMINANT RETINITIS PIGMENTOSA AND REVIEW OF
THE CLINICAL FINDINGS ASSOCIATED WITH IMPDH1 MUTATIONS

和田裕子、高橋真弓、多田麻子、板橋俊隆、阿部俊明、玉井 信
東北大学眼科学教室

Eliot L. Berson, Thaddeus P Dryja
Berman-Gund Laboratory for the Study of Retinal Degenerations and
the Ocular Molecular Genetics Institute, Harvard Medical School

Yuko Wada, Mayumi Takahashi, Asako Tada, Toshitaka Itabashi, Toshiaki Abe, and Makoto Tamai
Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine
Eliot L. Berson, Thaddeus P Dryja
Berman-Gund Laboratory for the Study of Retinal Degenerations and
the Ocular Molecular Genetics Institute, Harvard Medical School

【抄録】

現在まで、常染色体優性網膜色素変性の原因遺伝子は11種類報告されているが、その原因遺伝子異常の種類、頻度には人種差が認められる。IMPDH1 遺伝子は、11番目に報告された RP10 の候補遺伝子である。我々は欧米人及び日本人常染色体優性網膜色素変性の IMPDH1 遺伝子異常の頻度、種類を検討し IMPDH1 遺伝子異常がもたらす臨床像の違いを検討する事を目的とした。欧米人常染色体優性網膜色素変性症190家系中、7家系に、日本人常染色体優性網膜色素変性146家系中2家系に IMPDH1 遺伝子異常をみとめた。日本人に認められた変異は2種類とも新規変異であり、欧米人では、Asp226Asn 変異が高頻度変異であった。

Until now, 11 genes for ADRP have been identified. In 2002, it was reported that the IMPDH1 gene was the candidate gene in RP10 families, and it may account for 5-10% families with ADRP in American and European families. In this study, we determined the frequency and types of mutations in the IMPDH1 gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) in Japan and in the United States. The Asp226Asn was identified in 6 of the 190 unrelated ADRP patients from North America. In addition, one patient carried a novel missense change, Lys238Glu. In Japan, We identified two novel mutations, Leu227Pro and Lys238Arg mutations. After correcting for the fact that patients with identified mutations in some other ADRP genes were excluded from this study, we estimate that the missense mutations in the IMPDH1 gene, accounts for approximately 2% of cases with ADRP in the United States, 1.2% in Japan. These findings suggested that the kinds and frequency mutations varied with ethnic population.

キーワード . IMPDH1 遺伝子、常染色体優性網膜色素変性症、Asp226Asn 変異

Key Words : IMPDH1 gene, autosomal dominant retinitis pigmentosa, Asp226Asn mutation

緒言

現在までに11種類の常染色体優性網膜色素変性 (ADRP) の候補遺伝子が報告されている。IMPDH1 遺伝子は、2002年に RP10 の候補遺伝子として11番目に報告されて遺伝子である^{1)、2)}。視細胞での Cyclic nucleotide metabolism に重要な役割をはたし、さらに薬物療法が応用できる

可能性がある遺伝子として注目されている。現在までには3種類の変異のみが報告され、特に Asp226Asn 遺伝子異常が欧米人における高頻度変異である。一方、日本人網膜色素変性における FSCN2 遺伝子 208delG 変異³⁾、アレステン遺伝子 1147delA 変異^{4)、5)} など、日本人には海外の網膜色素変性患者で認められない変異を有しており、

遺伝子異常の頻度及び種類は、人種に大きく変化する事が考えられる。

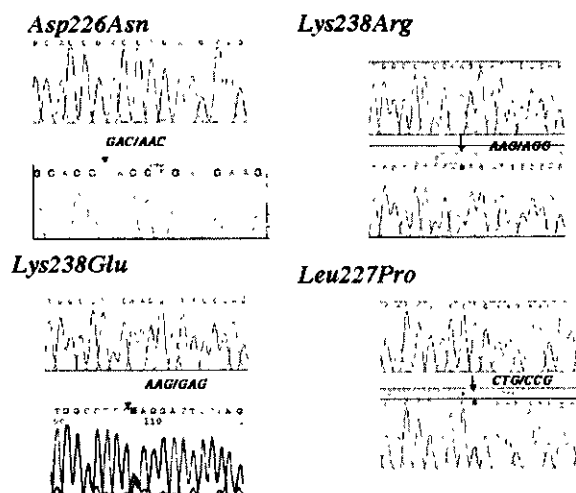
今回我々は、日本人および欧米人における IMPDH1 遺伝子異常を検討し、人種による遺伝子異常の違い、および臨床像の特徴をさぐる事を目的とした。

対象及び方法

日本人 ADRP 146家系、欧米人 ADRP 190家系を対象とした。エクソン1から14までの全ての翻訳領域スクリーニングするために、9種類のプライマーを用いて Direct sequence 法により塩基配列の決定を行った。(ABI3100) 遺伝子異常が認められた家系に対して、眼科的検査を施行し表現型との連鎖を確認した。眼科的検査として、矯正視力、精密細隙灯、ゴールドマン動量的視野、眼底検査、蛍光眼底撮影、色覚および網膜電図を行った。ゴールドマン動量的視野は steradian 解析を行い、定量化した。

結果

欧米人190家系中6家系に Asp226Asn 変異、1家系に新規 Lys238Glu 変異を確認した。日本人では Asp226Asn 変異は認められず、日本人家系2家系に新規変異 Leu227Pro 変異、Lys238Arg 変異を認めた。これらは調べる限りでは、表現型と連鎖していた。共通の polymorphism として Leu244Leu (allele frequency : 欧米人26%、日本人16%)、また日本人2家系に Thr255Thr (allele frequency 6.85%) 変異を認めた。Thr255Thr 変異は、欧米人には認められなかった。欧米人にのみ認められた sequence variant として、IVS2 + 57G → A (allele frequency 2.7)、IVS3 + 90C → T (8.9%)、IVS3 + 67G → A (2.9%)、IVS10 + 33C → T (10.3%)、Ala440Ala (24.3%)、IVS12 + 42G → A (3.24



シーケンスの結果を示す

%)、IVS12 + 32C → A (12.6%) が認められた。これらの polymorphism は splice site に影響を与えるものではなかった。この遺伝子異常をもつ患者の臨床像は、網膜電位図で桿体系と錐体系の振幅が同時に障害されると報告されているが、我々が23人の網膜電位図を解析した結果、桿体系優位に障害されていた。IMPDH1 遺伝子異常をもつ日本人常染色体優性網膜色素変性患者は、早期から ERG の振幅が消失し、視力も、10代で著しく低下していた。

考察

IMPDH1 遺伝子を用いた解析により、日本人 ADRP 患者は、高頻度変異である Asp226Asn 変異は確認できず、新規遺伝子変異 Leu227Pro 変異、Lys238Arg 変異を確認した。遺伝子異常の頻度は、今までに、確認した他の遺伝子変異を補正すると、欧米人で2%、日本人で1.2%であった。さらに、Sequence variant の結果から、日本人、欧米人の間では、遺伝子異常の頻度、種類においては、大きな違いが認められ、日本人は固有の遺伝子異常をもつ可能性が示唆された。

文献

- 1) Bowne SJ, Sullivan LS, Blanton SH, Cepko CL, Blackshaw S, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively JR, Daiger SP. Mutations in the mosine monophosphate dehydrogenase 1 gene (IMPDH1) cause the RP10 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Hum Mol Genet. 2002; 11: 559-68.
- 2) Kennan A, Aherne A, Palfi A, Humphries M, McKee A, Stitt A, Simpson DA, Demtroder K, Orntoft T, Ayuso C, Kenna PF, Farrar GJ, Humphries P. Identification of an IMPDH1 mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10) revealed following comparative microarray analysis of transcripts derived from retinas of wild-type and Rho (-/-) mice. Hum Mol Genet. 2002; 11: 547-57.
- 3) Wada Y, Abe T, Takeshita T, Sato T, Tamai M. Mutation of Human retinal fascin gene (FSCN2) causes autosomal dominant retinipigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 42, 2395-2410, 2001.
- 4) Nakazawa M, Wada Y, and Tamai M. Arrestin gene mutations in autosomal