

- recessive retinitis pigmentosa. Arch. Ophthalmol 116: 498-501, 1998
- 5) Wada Y, Nakazawa M, Abe T, Tamai M. mRNA analysis in Oguchi patients with 1147delA mutation in the arrestin gene. In "Retinal Degenerative Diseases and Experimental Therapy", ed, J. Hollyfield, R Anderson and M. LaVAil Plenum Publishing Corporation, New York, 151-156, 1999.

完全型先天停止性夜盲と NYX 遺伝子の変異

Novel NYX Mutations in Japanese Patients with Complete Type of Congenital Stationary Night Blindness.

中村 誠、林 建、伊藤 正、寺崎浩子、三宅養三
名古屋大

Makoto Nakamura, Ken Lin, Sei Ito, Hiroko Terasaki, Yozo Miyake
Department of Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine

【抄録】

Schubert-Bornschein 型の先天停止性夜盲の完全型では、比較的強い近視を伴い矯正視力は中等度低下しており、眼底には異常が認められず、ERG は negative type を示すことが特徴とされる。遺伝形式は性染色体劣性と常染色体劣性の 2 種類があり、近年欧米で性染色体劣性形式の場合の原因遺伝子は leucine-rich proteoglycan nyctalopin (NYX) 遺伝子であることが報告された。我々は臨床像から完全型と診断した計10家系12症例の NYX 遺伝子の検討を行ったところ、4 家系 6 症例に 4 種類の新規の変異を検出し、日本人でも NYX 遺伝子の異常により完全型が発症することが確認された。完全型のように 2 つの遺伝形式がある疾患では、家族歴からだけでは正確な遺伝形式が予想できないことが多く、遺伝形式の決定には遺伝子検査が有用であると考えられた。

The clinical characteristics of complete type of congenital stationary night blindness (CSNB) include essentially normal fundus, mildly depressed visual acuity, and high myopic refraction. The single bright-flash, mixed rod-cone electroretinogram has a negative configuration with the absence or a significant reduction of the oscillatory potentials. The hereditary pattern is X-linked recessive or autosomal recessive. Recently the leucine-rich proteoglycan nyctalopin gene (NYX) was identified as the mutated gene in X-linked recessive complete CSNB. We examined the NYX gene in 12 patients from 10 Japanese families with typical clinical features of complete CSNB, and identified 4 novel mutations in the gene in 6 patients from 4 families. Thus we confirmed that the NYX gene defects caused complete CSNB in Japanese. As regards complete CSNB, it was usually difficult to determine the hereditary pattern from family histories, and only molecular genetic examination could give the exact pattern.

キーワード：先天停止性夜盲、完全型、NYX 遺伝子、変異、遺伝子診断

Key Words : congenital stationary night blindness, complete type, NYX gene, mutation, DNA diagnosis

目 的

Schubert-Bornschein 型の先天停止性夜盲は、杆体機能が完全に欠如した完全型と、減弱はしているが消失はしていない不全型に分類される¹⁾。完全型では、比較的強い近視を伴い矯正視力は中等度低下しており、眼底には近視様変化以外に異常が認められず、ERG は negative type を示すことが特徴とされる。完全型には性染色体劣性遺伝形式と常染色体劣性遺伝形式のものがあるが、最近性染色体劣性遺伝形式の場合の原因遺伝子は leucine-rich proteoglycan nyctalopin (NYX) 遺伝子であることが報告された^{2), 3)}。今回我々は臨床像から完全型と診断した10家系12症例の NYX 遺伝子の検討を行い、臨床像や家族歴についても検討した。

方 法

インフォームドコンセントを得たうえで、典型的な完全型先天停止性夜盲の臨床像を呈する10家系12症例の末梢血白血球から染色体 DNA を抽出し、NYX 遺伝子のエクソン 1～3 を DNA Thermal Cycler 9700 (Perkin Elmer Corporation) を用いて PCR 法で増幅した。プライマーは Pusch らの報告³⁾ に従って LIFE TECHNOLOGIES ORIENTAL, Inc. より購入した。PCR を High Pure PCR Purification Kit (Boehringer Mannheim, GmbH) を用いて精製し、Dye terminator 法を用いて ABI 373 オートシーケンサーで直接塩基配列を決定した。また異常が認められたエクソンについては、コントロールとして正常100アレル (男性34名、女性33名) についても同様に塩基配列を決定した。また、視力、視野、色覚、眼底検査、ERG 等臨床

像の検討を行った。

結果

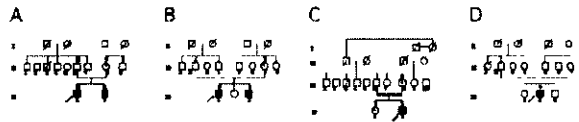
10家系12症例のうち4家系6症例に、4種類のNYX遺伝子の変異が検出された(図1)。すなわち家系Aには1156番のT→C(Cys386Arg)、家系Bには648番のC→G(Asn246Lys)のミスセンス変異、家系Cには790番の20bp挿入(フレームシフト)、家系Dにはexon3中の大きな欠失である。これらは全て新規の変異で、正常100アレルには認められなかった。臨床所見としてはほぼ全例で強い近視が認められ、矯正視力は0.6~0.8と中等度に低下している症例もあったが、両眼とも0.9~1.0と比較的良好な症例も多かった。眼底には近視様変化以外に特に異常は認められず、視野は特に異常なかった。色覚は第2異常を呈する症例が1症例あった以外は正常だった。眼位は正位のものが多かったが、外斜位や内斜位、上下斜位が認められるものもあった。眼振は認められず、全例で夜盲の自覚があった。ERGでは杆体系ERGは記録されず、錐体系ERGのb波の振幅は正常範囲または軽度で減弱していた。白色閃光によるERGではa波の振幅は正常範囲でb波の振幅は減弱しており、b波がa波より小さいnegative typeを呈した。律動様小波は認められなかった。これらの結果はすべて完全型の先天停止性夜盲の特徴に合致するものであるが、NYX遺伝子に変異が認められなかった症例でも、臨床像やERGの反応は同様だった。変異が検出された4家系のうちで典型的な性染色体劣性遺伝形式の家系図を示したものはなく、1家系(C)では両親が近親婚のため当初は常染色体劣性遺伝形式が疑われた(図1)。

考察

我々は以前に先天停止性夜盲が完全型と不全型に分類できることを報告したが、近年の分子遺伝学的研究により、不全型はCACNA1F遺伝子の変異により生じ^{1)~7)}、性染色体劣性遺伝形式の完全型はNYX遺伝子の変異により生じることが報告された^{2), 3)}。常染色体劣性遺伝形式の完全型の原因遺伝子は未だ明らかにされていない。完全型先天停止性夜盲の分子遺伝学的検討は最初の2つの報告^{2), 3)}以来追加報告はなかったが、本研究で日本人の完全型先天停止性夜盲の症例について検討したところ、約半数の症例でNYX遺伝子の変異が認められ、日本人でもNYX遺伝子の変異により完全型先天停止性夜盲が発症することが確認された。

今回検討した完全型先天停止性夜盲で、NYX

NYX遺伝子の変異(+)の完全型先天停止性夜盲の家系図



NYX遺伝子の変異(-)の完全型先天停止性夜盲の家系図

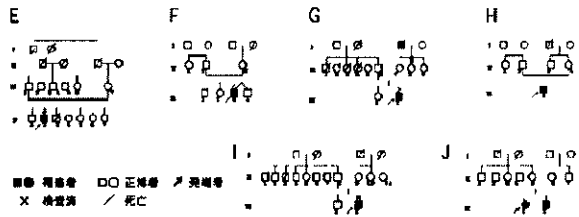


図1 今回検討した完全型先天停止性夜盲10家系の家系図

4家系(A~D)ではNYX遺伝子に変異が検出され、実際には性染色体劣性遺伝形式と考えられる。6家系(E~J)ではNYX遺伝子に変異が検出されず、実際の遺伝形式は常染色体劣性の可能性が高い。

遺伝子に変異が認められた4家系のうち、家族歴から明らかな性染色体劣性遺伝形式を示した家系はなかったが、X染色体上に位置するNYX遺伝子に変異が検出されたことにより、実際にはこれら4家系とも性染色体劣性遺伝形式で疾患が発症すると考えられた。またNYX遺伝子に変異が認められなかった6家系のうち親族結婚が認められたのは1家系しかなく、4症例は孤発例で家系内に近親婚もないため遺伝形式の予想は困難だったが、NYX遺伝子に異常が認められなかったことから常染色体劣性遺伝形式の可能性が高いと考えられた。このように完全型先天停止性夜盲では家族歴のみから真の遺伝形式を推定することは非常に困難であることが判明したが、これは近年の近親結婚の減少や少子化の傾向にも起因すると考えられた。また今回検討した症例のうち、NYX遺伝子に異常が認められた症例のグループと認められなかった症例のグループでは、原因遺伝子が異なるはずであるにも関わらず、ERGの反応も含めて臨床像は極めてよく類似しており、完全型では臨床像の違いから遺伝形式を推定することも不可能と考えられる。完全型先天停止性夜盲のように2つの異なる遺伝形式がある疾患では、家族歴からだけでは正確な遺伝形式が予想できないことも多く、遺伝形式の決定には遺伝子検査が極めて有用であると考えられた。

文献

- 1) Miyake Y, Yagasaki K, Horiguchi M, Kawase Y, Kanda T. Congenital

- stationary night blindness with negative electroretinogram. A new classification. *Arch Ophthalmol.* 1986; 104: 1013-1020.
- 2) Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, et al. Mutations in NYX, encoding the leucine-rich proteoglycan nyctalopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 2000; 26: 319-323.
 - 3) Pusch CM, Zeitz C, Brandau O, et al. The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein. *Nat Genet.* 2000; 26: 324-327.
 - 4) Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, et al. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 1998; 19: 260-263.
 - 5) Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, et al. Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11. 23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 1998; 19: 264-267.
 - 6) Nakamura M, Ito S, Terasaki H, Miyake Y. Novel CACNA1F mutations in Japanese patients with incomplete congenital stationary night blindness. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 1610-1616.
 - 7) Nakamura M, Ito S, Terasaki H, Miyake Y. Incomplete congenital stationary night blindness associated with symmetrical retinal atrophy. *Am J Ophthalmol.* 2002; 134: 463-465.

抗網膜抗体を有する網膜色素変性様症例

Retinitis pigmentosa-like retinopathy cases with anti-retina antibody

高橋政代¹、大音壮太郎²、雨宮かおり²、沢村 恵²、本田孔士²

1：京都大学附属病院探索医療センター開発部、2：京都大学視覚病態学

Masayo Takahashi¹, Sotaro Ohoto², Kaori Amemiya², Megumi Sawamura², Yoshihito Honda²

1：Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital

2：Department of Ophthalmology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

【抄録】

目的：急速に進行する網膜色素変性様症例の中に、血清中に抗網膜抗体を有する症例を認めたので報告する。

対象及び方法：視野狭窄、視力低下を認め、さらに網膜電図異常があり網膜色素変性としてフォローしている症例のうち、進行の急速な8例について、血清中に網膜に対する自己抗体が存在するかどうかを、サル網膜を用いて、ウェスタンブロット法にて検証した。

結果：8例中4例においてウェスタンブロットで陽性バンドがみられ、網膜タンパクに対する血清抗体の存在が示された。網膜に対する抗体を有する症例は2例は無色素性で、遺伝形式は3例孤発例で4例中2例は家族歴にリウマチなどの自己免疫性疾患があった。なお、全例フォローアップ中に悪性腫瘍の発生は認められなかった。

結論：抗網膜抗体が網膜色素変性症様症状を惹起あるいは増悪させている可能性もある。しかし、自己免疫網膜症と診断するためにはさらに検討が必要である。

Retinitis Pigmentosa with anti-retinal antibody

PURPOSE: We report that anti-retinal antibodies were found in the patients with retinitis pigmentosa-like retinopathy who had rapid visual loss.

METHODS: We picked up 8 patients who had rapid visual field loss, central vision loss, and abnormal ERG. Patient sera were tested for anti-retinal antibodies by Western blot analysis.

RESULTS: Four patients' sera demonstrated positively labeled bands on Western blots, which means the expression of anti-retinal antibodies. 2 of them had no pigmentation in the fundus, 3 had no family history of retinitis pigmentosa, and 2 had the family history of autoimmune disease such as rheumatism. None of them had any sign of cancer.

CONCLUSIONS: Anti-retinal antibodies might lead to, or worsen the symptoms resembling retinitis pigmentosa. Further study is necessary to diagnose the autoimmune retinopathy.

キーワード：網膜色素変性、抗網膜抗体、視野狭窄、自己免疫網膜症、Western blotting

はじめに

近年、自己免疫網膜症（autoimmune retinopathy）と呼ばれる病態が提唱されている^{1), 2), 3)}。過去の報告からこの病態の特徴をまとめると、①数ヶ月から数年で進行する急速な視力低下、視野狭窄②眼底は血管狭細化はみられるものの、色素沈着が少ない無色素性色素変性症様③ERG異常：subnormal～non-recordable④家族歴：網膜色素変性症の家族歴がなく、リウマチ等自己免疫疾患の家族歴が多い⑤既往歴：現在及び過去に腫瘍の既往なし⑥血清中に抗リカバリン抗体を代表とする網膜に対する自己抗体を認める、というものである。

今回我々は自己免疫網膜症の疑われる症例を経

験したので報告する。

対象

①視野狭窄・視力低下を認め、②ERGにてa波b波消失あるいは減弱しているこの2条件を認め、網膜色素変性症として経過観察中の症例のうち、視野狭窄・視力低下の進行が急速な症例を対象とした。ただし、parafoveal typeの網膜色素変性症は残存する中心視野が小さく、変性が中心窩に及んだ場合急速な視力低下を来すことがあるので、今回の検討から除外した。

方法

対象患者より研究内容の説明と同意により採血

し、血清を分離した。

Western blotting: 抗原として成体サルの網膜可溶性分画を用いた。タンパク試料は30 μ g を SDS (sodium dodecyl sulfate) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane に転写した。転写後5% skim milk で blocking を行った。一次抗体として患者血清(100倍希釈)を用い、4度で一晩 incubate した。PBS で洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼで標識された anti-human IgG (caltag: 1:1000) を用い室温で1時間 incubate した。PBS で洗浄後、ジアミノベンチジン/H₂O₂ を基質に用いて染色、検出した。

結果

今回対象となった症例は8例で、男性1例、女性7例であった。眼底所見は5例は色素沈着を認めない無色素性網膜色素変性症様であった。家族歴は7例が孤発例、1例は常染色体劣性の遺伝形式であった。Western blotting 法の結果、8例中4例にサル網膜に対する陽性バンドが認められた。表1に抗網膜抗体陽性症例を示す。

ここで一例代表症例を呈示する。症例は53歳の女性で、30代半ば頃より photopsia を自覚、40歳の時に普通免許更新できなくなり、40代半ば

で近医にて網膜色素変性症と診断された。H 9. 4月(49歳時)、視野: 輪状暗点、ERG: non-recordable で、当院紹介前最終視力は RV = LV = (0.01) であった。家族歴に網膜色素変性症はなく、母にリウマチの既往があった。

H13. 8.10当院受診し、視力は RV = 30cm 指数弁 (0.01)、LV = 0.01 (n.c) であった。眼底には血管狭細化はみられるものの、色素沈着は見られなかった(図1A)。初診時視野を図1Bに示す。

Western blot 法施行し、サル網膜21kd タンパク質に対する血清抗体の出現を認め(図2)、自己免疫網膜症の疑いにてH13.12.25よりプレドニン投与を開始した。H14. 1. 8視力 RV = 0.02 (n.c)、LV = 0.04 (n.c)、H14. 2. 5視力 RV = 0.02 (n.c)、LV = 0.05p (n.c) で、プレドニン維持投与中の視野を図3に示す。視力及び視野に有意な改善は得られてないものの、安定した状態は保っている。

考察

今回我々は、家族歴、症状、性別、年齢、眼底所見及び抗網膜抗体の存在から自己免疫網膜症を疑わせる症例を経験した。8例中4例に抗網膜抗体が認められたが、色素沈着のある症例では抗網膜抗体が疾患の原因である可能性と、網膜変性が

症例	年齢	性別	初診時視力 (R, L)	色素沈着	抗体	備考
1	45	F	HM, HM	有	28	白内障術後急速進行
2	53	F	0.01, 0.01	無	21	症例呈示
3	62	F	0.6, LS	有	43	左原因不明の視力低下
4	43	F	0.4, 0.4	無	20	母リウマチ

表1 抗網膜抗体陽性例

western blot 法の結果8例中4例に抗網膜抗体が陽性であり、全て中年女性で、2例が無色素性であった。家族歴に母にリウマチがあるものが2例あった。

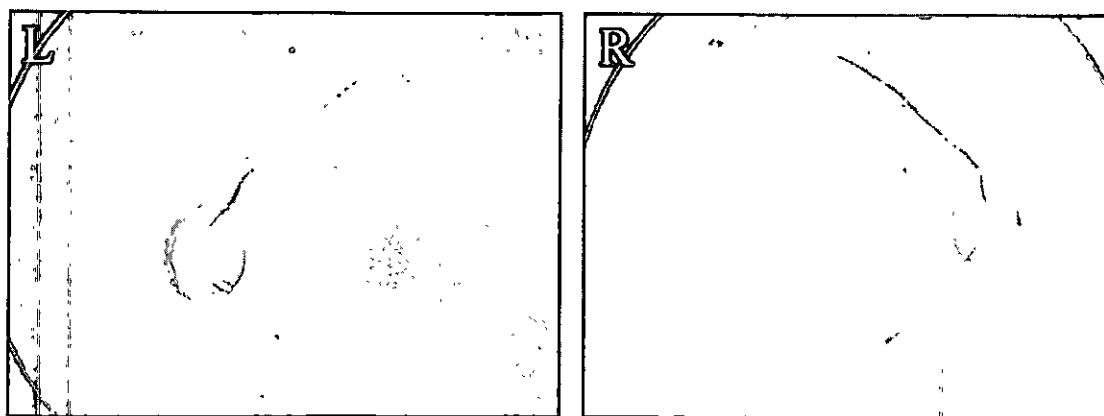


図1A 初診時眼底写真

血管狭細化はみられるが、色素沈着は認められない。

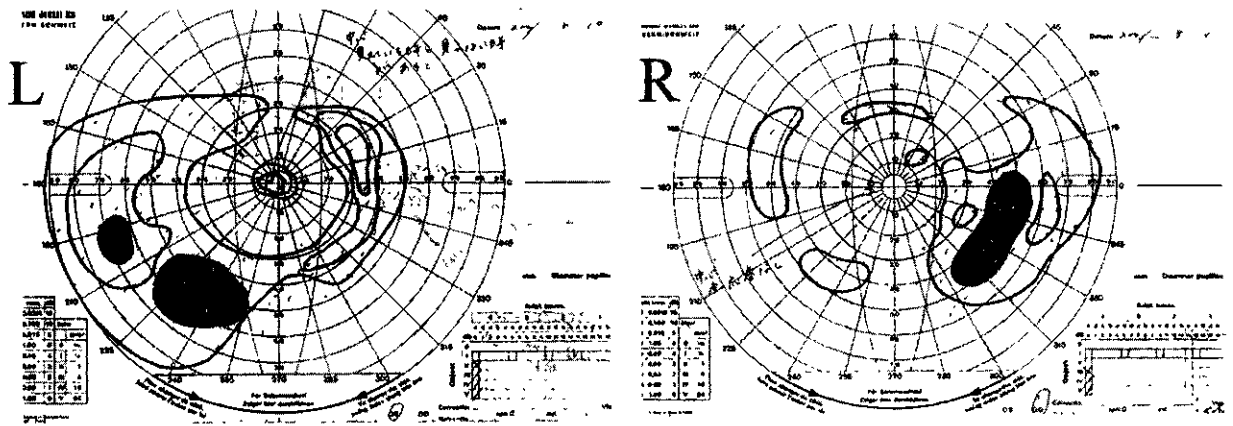


図1B 初診時視野

著明な視野狭窄（輪状暗点～求心性狭窄）を認めた。

先に起こり二次的に抗網膜抗体が産生されたものである可能性が考えられ、必ずしも抗網膜抗体が陽性であるからといって自己免疫疾患であるとはいえない。確定診断のためには検出された抗網膜抗体が網膜変性の原因であるかを確認する別の方法が必要である。しかし抗網膜抗体が網膜色素変性症による二次的なものであったとしても、それが網膜変性を悪化させている可能性があり、網膜色素変性症の治療法を探る上で網膜抗体と網膜変性の関係を研究することは意義深いことである。

今回先に挙げた代表症例を含め数例にステロイド投与を行い、症状の安定化は得られている。しかし自然経過にても安定していた可能性も高い。過去の報告でもステロイド内服により有意に改善したものはなく、ステロイド等の治療効果については今後の慎重な検討を要する。

従来網膜色素変性症と診断されていた症例のうちにも自己免疫網膜症が含まれていた可能性が充分考えられ、自己免疫網膜症の診断方法を確立させ、網膜色素変性症と区別し、治療の可能性を検討していくことは重要であると考えられる。



図2 western blot 法

サル網膜可溶性タンパク21kd に対する陽性バンドを認めた。

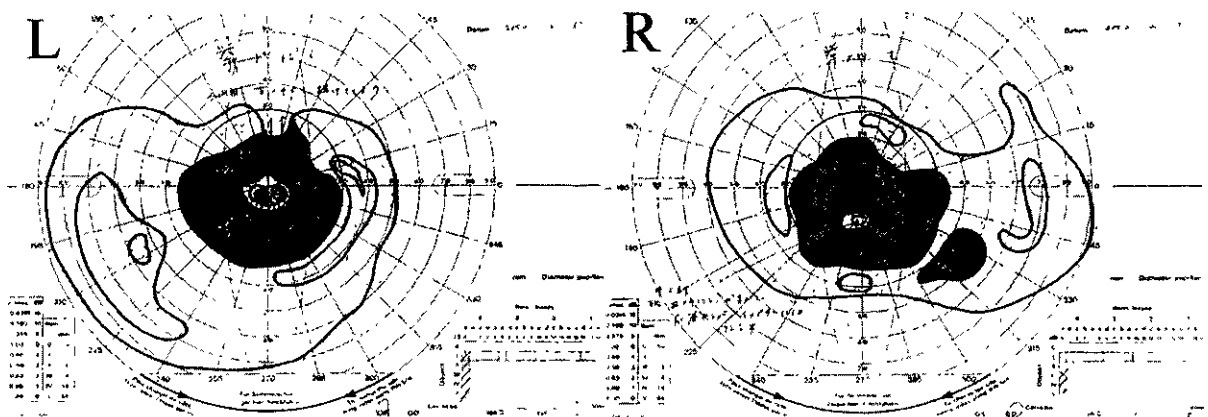


図3 プレドニン維持投与中の視野

文 献

- 1) Heckenlively JR, Fawzi AA, Oversier J, Jordan BL, Aptsiauri N. Autoimmune retinopathy: patients with antirecoverin immunoreactivity and panretinal degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2000; 118: 1525-33.
- 2) Mizener JB, Kimura AE, Adamus G, Thirkill CE, Goeken JA, Kardon RH. Autoimmune retinopathy in the absence of cancer. *Am J Ophthalmol.* 1997; 123: 607-18.
- 3) Whitcup SM, Vistica BP, Milam AH, Nussenblatt RB, Gery I. Recoverin-associated retinopathy: a clinically and immunologically distinctive disease. *Am J Ophthalmol.* 1998; 126: 230-7.

先天網膜異形成における ND gene および RS1 gene の検討

Paired assessment of the ND and RS1 genes in patients with congenital retinal dysplastic diseases

伊佐敷靖¹、坂本泰二²

1 : 鹿児島大学医学部附属難治性ウイルス疾患研究センター、2 : 鹿児島大学医学部眼科学教室

Yasushi Isashiki¹, Taiji Sakamoto²

¹Division of Molecular Pathology and Genetic epidemiology, Center for Chronic Viral Diseases,

²Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

【抄録】

目的 : Norrie 病 (ND) と X 連鎖性先天網膜分離 (RS) とのオーバーラップを想定して、先天網膜異形成の症例について、ND gene および RS1 gene を検討した。

対象 : ND 9 例、RS 6 例、PHPV 4 例、FEVR 4 例、および分類不能の先天網膜異形成 1 例 (計 24 例) を検索対象とした。方法 : 末梢静脈血から抽出した DNA 試料から、それぞれの遺伝子断片を増幅し、塩基配列を決定した。変異が検出された場合には、家系試料および対照試料について変異の有無を検定した。結果 : ND gene では、開始コドン変異、C95R 変異、エキソン 2 重複およびエキソン 1 の挿入変異が検出され、表現型はいずれも定型的な ND であった。RS1 gene では、定型 RS 全例に 5 種類のミスセンス変異および 1 種類のフレームシフト変異が検出された。上記以外の症例では、ND gene および RS1 gene ともに病的変異を認めなかった。結論 : ND と RS とは臨床的にも分子的にも独立の遺伝病である。

Purpose: Considering an overlap with the Norrie disease (ND) and X-linked retinoschisis (RS), the ND and RS1 genes were simultaneously examined for the patients with congenital retinal dysplastic diseases.

Objective: Total of 24 patients were applicable: 9 ND, 6 RS, 4 PHPV, 4 FEVR and one unclassified patients.

Methods: Nucleotide sequences of the amplified exons in both genes were determined in all the patients.

When a variation was detected, the family member (s) and a control population were approved for the relevant variation.

Results: An initiator mutation, Cys95Arg, a tandem duplication of exon 2 and an insertional mutation of exon 1 were detected in the ND gene. Clinical phenotype of these patients was typical ND.

For the RS1 gene, five kinds of missense mutations and one frame-shift mutation were detected in all fixed form RS. Neither of the ND gene or RS1 gene showed a morbid variation with a case except for the above. Conclusion: ND and RS are independent hereditary diseases in the clinical target as well from the viewpoint of molecular genetics as well.

キーワード : 先天網膜異形成、X-連鎖性遺伝、Norrie 病、先天網膜分離、遺伝子変異

Key Words : congenital retinal dysplasia, X-linked hereditary disease, Norrie disease, X-linked retinoschisis, molecular genetic assessment

緒言

Norrie 病は、重度の網膜硝子体異形成を主要徴候とする X 連鎖性遺伝病で、疾病遺伝子 (ND gene) に約 70 種類の変異が確認されている。一方、比較的視機能が保たれる X 連鎖性先天網膜分離 (以下、先天網膜分離) では、疾病遺伝子 (RS1 gene) に約 140 種類の変異が確認されている。両者ともに、当該遺伝子変異を持つ報告家系が国内外で蓄積されつつある^{1), 2)}。ND gene の遺伝子変異モデル動物では網膜分離に類似する眼底所見が観察される³⁾。また、RS1 gene 変異と ND gene 非翻訳領域の異常とが同時にみられる

稀な先天網膜分離家系の報告がある⁴⁾。このような背景から、Norrie 病と先天網膜分離とのオーバーラップを想定して、さまざまな先天網膜異形成症例について、ND gene および RS1 gene を検討した。

対象と方法

Norrie 病 5 家系、Norrie 病様の臨床徴候を示す孤発例 4 例、先天網膜分離 6 家系、両眼性の第一次硝子体過形成遺残 4 例、家族歴陽性の滲出性硝子体網膜症 4 家系、および分類不能の先天網膜異形成 1 例を検索対象とした。説明による同意を

表1. ND gene および RS1 gene を検索した症例

No.	性別	診断	家族歴*	遺伝子所見 ND gene	RS1 gene
1	男	ND	+	開始コドン変異	—
2	男	ND	+	開始コドン変異	—
3	男	ND	+	C95R	—
4	男	ND	+	エキソン2重複	—
5	男	ND	+	exon 1 insertion?	—
6	男	ND	—	—	—
7	男	ND	—	—	—
8	男	ND?	—	—	—
9	女	ND-like	—	—	—
10	男	RS	+	—	R102W
11	男	RS	+	—	R200H
12	男	RS	+	—	300delG
13	男	RS	+	—	P192S
14	男	RS	+	—	N179D
15	男	RS	+	—	E72K
16	女	PHPV	—	—	—
17	男	PHPV	—	—	—
18	男	PHPV	—	—	—
19	男	PHPV	—	—	—
20	男	FEVR	+1	—	—
21	男	FEVR	+2	—	—
22	男	FEVR	+3	—	—
23	男	FEVR	+3	—	—
24	女	分類不能	—	—	—

ND: Norrie病; RS: X連鎖性先天網膜分離; PHPV: 第一次硝子体過形成遺残; FEVR: 家族性滲出性硝子体網膜症. */ 1: 母方の祖父がFEVR; 2: 母方の叔父が先天盲; 3: 一卵性双生児. 試料提供(順不同): 順天堂大学、千葉県こども病院、千葉大学、帝京大学、帝京大学(市原)、慶応義塾大学、筑波大学、北里大学、名古屋大学、琉球大学、鹿児島大学.

得た後、末梢静脈血約 5 ml を採取した。

採取した末梢静脈血から、市販の核酸抽出キットを用いて DNA を抽出した。それぞれの DNA 試料を鋳型として、ND gene では非翻訳エキソン (エキソン 1) を含む 3 個のエキソンを、RS1 gene では 6 個の翻訳エキソンを、PCR 法で増幅した。増幅断片の塩基配列を直接法あるいはサブクローニング法で決定した。病的変異が検出された場合には、制限酵素消化などの方法で、発病者、保因者および対照集団について当該変異の有無を検討した。

結果

ND gene では、これまでに確認できた 3 種類の変異 (翻訳開始コドン変異、Cys95Arg 変異、エキソン 2 重複) に加えて、エキソン 1 の挿入変異が検出された。変異家系の表現型はいずれも定型的な Norrie 病であった。また、滲出性硝子体網膜症の 1 家系で、発病者の父親および姉にエキソン 1 の CT repeat 短縮が検出されたが、発病者とその母親は正常であった (図 1)。すなわち、定型的な Norrie 病以外の症例では ND gene の病的変異は検出されなかった (表 1)。

RS1 gene では、先天網膜分離と診断された全家系に 5 種類の変異 (Glu72Lys、Arg102Trp、Asn179Asp、Pro192Ser、Arg200

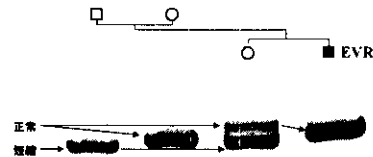


図 1

ND gene にみられたエキソン 1 の CT repeat 短縮。父親は短縮のみのヘミ接合であるが、母親は正常ホモ接合、姉はヘテロ接合、滲出性硝子体網膜症の男性発病者 (■ EVR) は正常のみのヘミ接合であり、疾病と連鎖しない遺伝子多型とみなされる。それぞれの断片の易動度には、レーンによって若干のずれがある。

His) および 300delG によるフレームシフト変異が検出された (図 2)。先天網膜分離以外の症例では、RS1 gene の病的変異は検出されなかった (表 1)。

考察

ND gene エキソン 2 欠失マウスでは、水晶体後方の構造物や神経節細胞層の崩壊などの所見とともに、網膜分離に類似する眼底所見が観察され

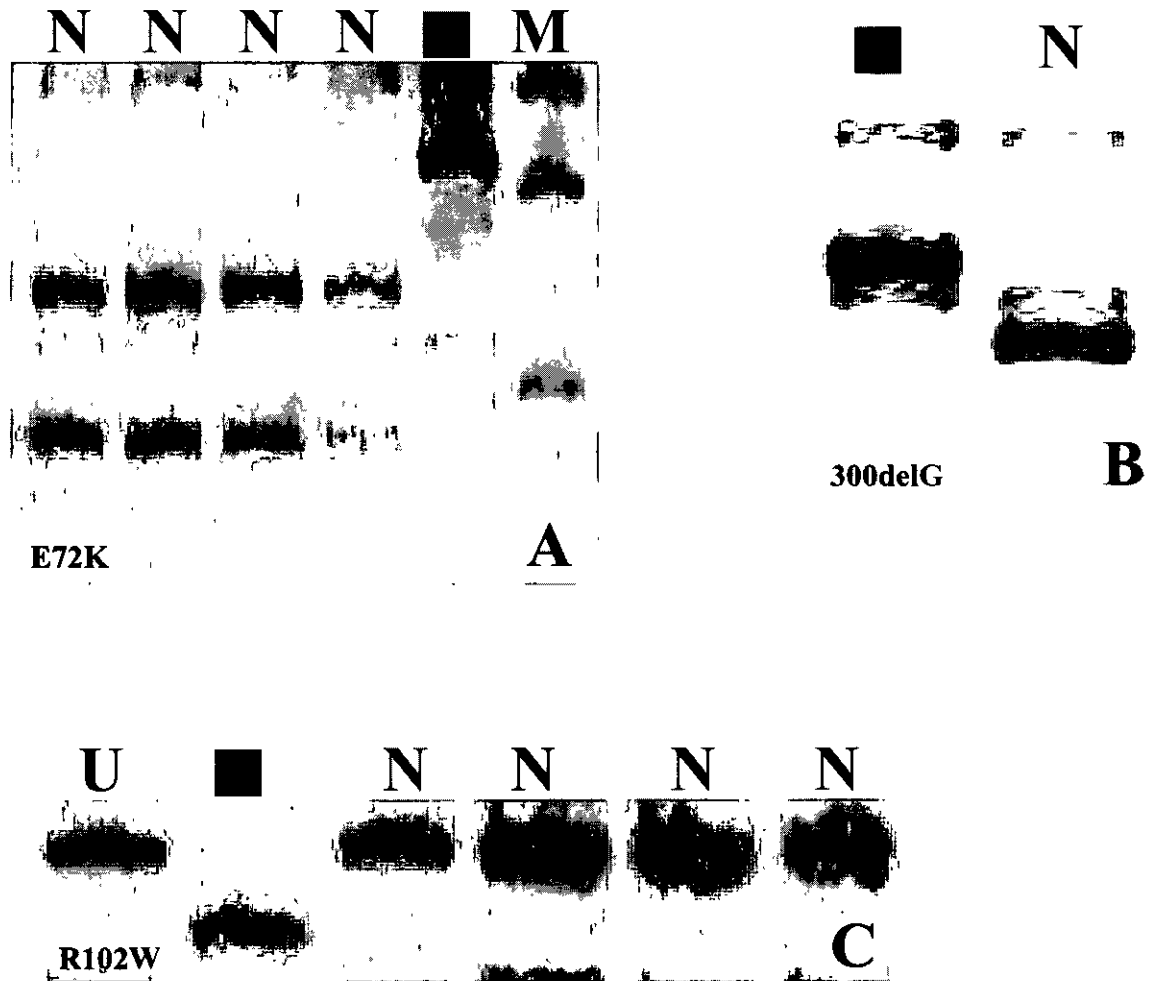


図 2

制限酵素消化による RS1 遺伝子変異検出の事例。■：変異症例；N：正常；M：分子量マーカー；U：未処理の遺伝子断片。A) Glu72Lys があると、Taq I の認識部位が消失する。B) 300delG によって、Hae III の認識部位が消失する。C) Arg102Trp によって、Bst NI のあたらしい認識部位ができる。

る³⁾。また、RS1 gene 欠損マウスでは、網膜の囊胞状変化に加えて網膜全層の異常がある⁵⁾。このような、モデル動物にみられる組織学的所見の類似性に着目して、上述の検討を行った。検討したかぎりでは、ND gene 変異と RS1 gene 変異とはそれぞれ独立の臨床表現を示し、非定型的な症例にはどちらの病的変異も検出されなかった。Shastry らは、RS1 gene 変異陰性の先天網膜分離 5 例について ND gene を検討して、病的変異がみられなかったことを報告している⁶⁾。

本研究で検出された ND gene 変異では、翻訳開始コドン変異による遺伝子欠失と同等の効果、システインのアミノ酸置換による蛋白高次構造の大きな変化というような、強い変異効果が推察される⁷⁾。これまでに登録された ND gene 変異全体を概観しても、同様の傾向がみられる¹⁾。最近報告した本邦の Norrie 病家系もこの例にもれない⁸⁾。また、同じ ND gene 変異が独立した複数

の家系にみられることは極めて稀である。このことは Norrie 病が稀で重篤な先天異常であることを反映しているのかもしれない。

RS1 gene では、標準的なミスセンス変異が検出される頻度が高い²⁾。また、人種を超えた複数の家系に、同じ変異がしばしば検出される。本研究で検出できた 6 種類の変異においても、新規変異は Asn179Asp のみであった⁹⁾。他の 5 種類の変異は欧米人あるいは日本人での報告があり、中でも Glu72Lys はこれまでに約 40 家系の報告がある。病期によって臨床像に若干の修飾があるが、RS1 gene 変異の表現型は先天網膜分離である。本研究でも示されたように、臨床所見から先天網膜分離と診断される場合には RS1 gene 変異が検出される頻度が高いので、遺伝子診断の意義が特に大きいと思われる。

Hiraoka らは RS1 gene のミスセンス変異 (Arg102Glu) と ND gene エキソン 1 の CT

repeat 短縮とが同時にみられる稀な先天網膜分離家系を報告し、二遺伝子性 (di-genic heredity) の可能性を指摘している⁴⁾。本研究では、滲出性硝子体網膜症の1家系にCT repeat 短縮が検出されたが、疾病との連鎖はなかった。また、Arg102Gluと同じコドンのミスセンス変異 (Arg102Trp) 例の臨床像は先天網膜分離であり、ND gene は正常であった。したがって、先天網膜分離での二遺伝子性は考えにくいであろう。Norrie 病と先天網膜分離とは臨床的にも分子的にも独立の遺伝病である。

貴重な検体を提供していただいた研究施設の先生方に感謝します。試料提供施設 (順不同) : 順天堂大学眼科、千葉県こども病院眼科、千葉大学産婦人科、帝京大学眼科、帝京大学眼科 (市原)、慶応義塾大学眼科、筑波大学眼科、北里大学眼科、名古屋大学眼科、琉球大学眼科。

文 献

- 1) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/> (updated for NDP in Jan, 2003).
- 2) The Human Gene Mutation Database Cardiff. <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>. (updated for RSl in Jan, 2003).
- 3) Berger W, van de Pol D, Bachner D, Oerlemans F, Winkens H, Hameister H, Wieringa B, Hendriks W, Ropers HH. An animal model for Norrie disease (ND): gene targeting of the mouse ND gene. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 51-59.
- 4) Hiraoka M, Rossi F, Trese MT, Shastry BS. X-linked juvenile retinoschisis: mutations at the retinoschisis and Norrie disease gene loci? *J Hum Genet* 2001; 46: 53-56.
- 5) Weber BH, Schrewe H, Molday LL, Gehrig A, White KL, Seeliger MW, Jaissle GB, Friedburg C, Tamm E, Molday RS. Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, Rslh, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6222-6227.
- 6) Shastry BS, Hiraoka M, Trese MT. Lack of association of the Norrie disease gene with retinoschisis phenotype. *Jpn J Ophthalmol* 2000; 44: 627-629.
- 7) Isashiki Y, Ohba N, Yanagita T, et al. Mutations in the Norrie disease gene: a new mutation in a Japanese family. *Br J Ophthalmol* 1995; 79: 703-708.
- 8) Hatsukawa Y, Nakao T, Yamagishi T, Okamoto N, Isashiki Y: Novel nonsense mutation (Tyr44stop) of the Norrie disease gene in a Japanese family. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 1452-1453.
- 9) Tuvdendorj D, Isashiki Y, Ohba N, Sonoda S, Izumo S. Two Japanese patients with mutations in the XLRSl gene. *Retina* 2002; 22: 354-357.

rd マウス網膜に対するカルシウム拮抗剤の影響

Effect of calcium channel blockers on retinal morphology of rd mouse

高野淑子、大黒 浩、目時友美、中沢 満
弘前大学

Yoshiko Takano, Hiroshi Ohguro, Tomomi Metoki, Mitsuru Nakazawa
Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

【抄録】

目的：網膜色素変性に対する有効な治療法を確立するために、網膜変性動物のひとつである rd マウスの変性過程に対してカルシウム拮抗剤を用いてその効果を検討した。

方法：4種類のカルシウム拮抗剤（ニルバジピン、ニフェジピン、ジルチアゼム、ニカルジピン）を生後3週令の rd マウスに連日1回腹腔内投与し、1週後に網膜機能と形態を検討した。

結果：網膜組織において、カルシウム拮抗剤投与群では基剤投与群に比べ視細胞の厚さは若干保たれていたが、統計学的な有意差はみられなかった。また ERG の振幅も両群で有意な差はみられなかった。

結論：これらの結果からカルシウム拮抗剤は rd マウスの網膜において視細胞変性の進行抑制に関与している可能性はあるが、網膜変性進行末期では、その効果は認められなかった。

Purpose: Retinal degeneration mouse (rd mouse) has been studied for understanding the molecular pathology of inherited retinal degeneration, such as retinal pigmentosa. In the present study, we studied drug effects of Ca²⁺ antagonists on the retinal degeneration of rd mouse to evaluate their efficacy.

Method: Several kinds of Ca²⁺ antagonists, diltiazem, nifedipine, nilvadipine or nifedipine, were intraperitoneal administrated and thereafter retinal morphology and functions were analyzed.

Result: We found that systemic administration of Ca²⁺ antagonists caused a little preservation of retinal morphology in rd mouse during the advanced stage of retinal degeneration.

Conclusion: Based upon these data, it is suggested that some Ca²⁺ antagonists might be beneficial for the preservation of photoreceptor cells in rd mouse. But during the advanced stage of retinal degeneration, the effect of Ca²⁺ antagonists was not revealed.

キーワード：網膜変性、網膜色素変性症、rd マウス、カルシウム拮抗剤

緒言

網膜色素変性症のモデル動物として知られる rd マウスは、生後8日頃より網膜変性が認められ、光学顕微鏡下で視細胞の変性は10日以降に明らかになる。杆体の変性は急速に進行し、生後1か月頃にはほぼ変性消失する。また、その原因として杆体の cGMP phosphodiesterase の β -subunit に遺伝子変異があるためとされている。

網膜変性に関する治療研究として近年、rd マウスにおいてカルシウム拮抗剤である D-cis-diltiazem が視細胞変性を抑制し、視機能を保護するという画期的な報告があった¹⁾。しかし、D-cis-diltiazem に関しては、その後の追試において再現性がなく、その効果については賛否両論がある。また、網膜色素変性症のモデル動物としてもうひとつ有名な RCS ラットにおいては、Yamazaki らが、カルシウム拮抗剤であるニル

バジピンの腹腔内投与でその視細胞変性を抑制し、視機能を保護することを報告している²⁾。

そこで今回、rd マウスに対してカルシウム拮抗剤が網膜変性に有効か否かを、薬理作用の異なる種々の薬剤を用いて検討した。

方法

生後3週令の rd マウスに1週間連日、カルシウム拮抗剤（ニルバジピン、ニフェジピン、ジルチアゼム、ニカルジピン）とその基剤を腹腔内投与し、網膜機能と形態を検討した。すなわち、薬剤投与1週間後、網膜機能を ERG で、網膜形態をヘマトキシリン・エオジン染色にて光学顕微鏡下で評価し、統計学的検討を加えた。

結果

生後3週令より開始した実験では、網膜組織に

においてはカルシウム拮抗剤投与群が、基剤投与群に対し若干視細胞層の保存が認められたが、統計学的有意差はみられなかった。また、ERGにおいても薬剤投与群と基剤投与群では有意差はなかった。

考 察

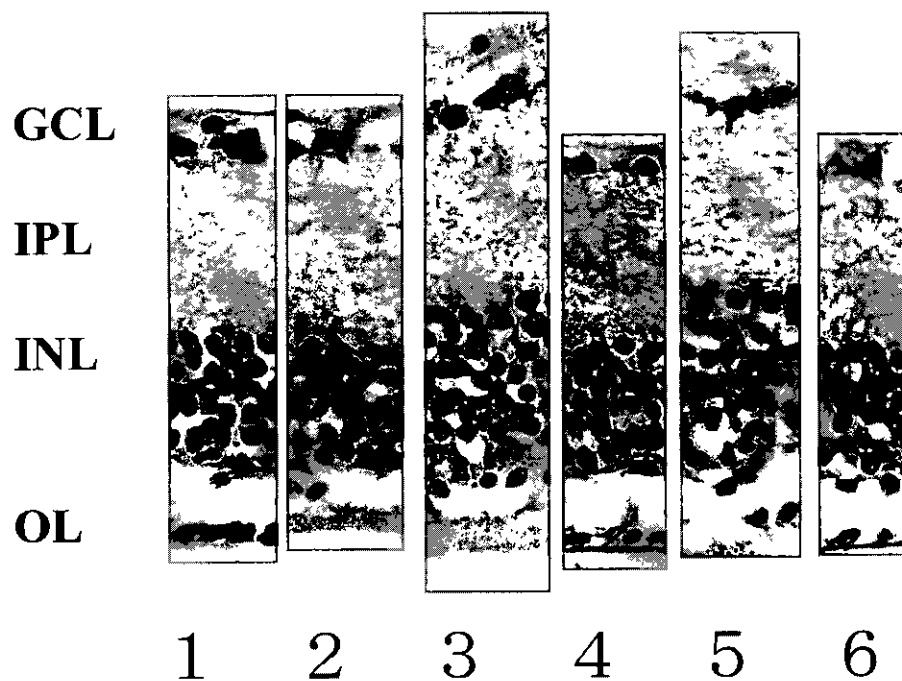
カルシウム拮抗剤の神経保護効果として、細胞内への Ca^{2+} 流入を抑え、細胞内 Ca^{2+} 濃度を低下させることで、アポトーシスを抑制すると推測される。実際にrdマウスの他に、脳や網膜の虚血性変化をもつモデル動物においてもその効果が示されている。カルシウム拮抗剤の網膜変性抑制機序を考える際に重要なのが、視覚情報伝達経路の視興奮の停止と順応の過程である。この過程で、光退色したロドプシンをリン酸化するロドプシンキナーゼの制御に Ca^{2+} が関与しており、この部位にカルシウム拮抗剤が作用すると考えられる。

今回の研究では、rdマウスの生後3週令以降の網膜におけるカルシウム拮抗剤の影響について検討した。網膜変性の進行してしまった時期に対しては、カルシウム拮抗剤は無効であり、今後、網膜変性進行前、すなわち生後早期に同様の検討をすれば、有意な差がでる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Frasson M et al.: Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium channel blocker in the rd mouse.: Nat Med (5) 1183-1187, 1999
- 2) Yamazaki H et al.: Preservation of retinal morphology and functions in royal college surgeons rat by nilvadipine, a Ca antagonist.: IOVS (43) 919-926, 2002

図 1

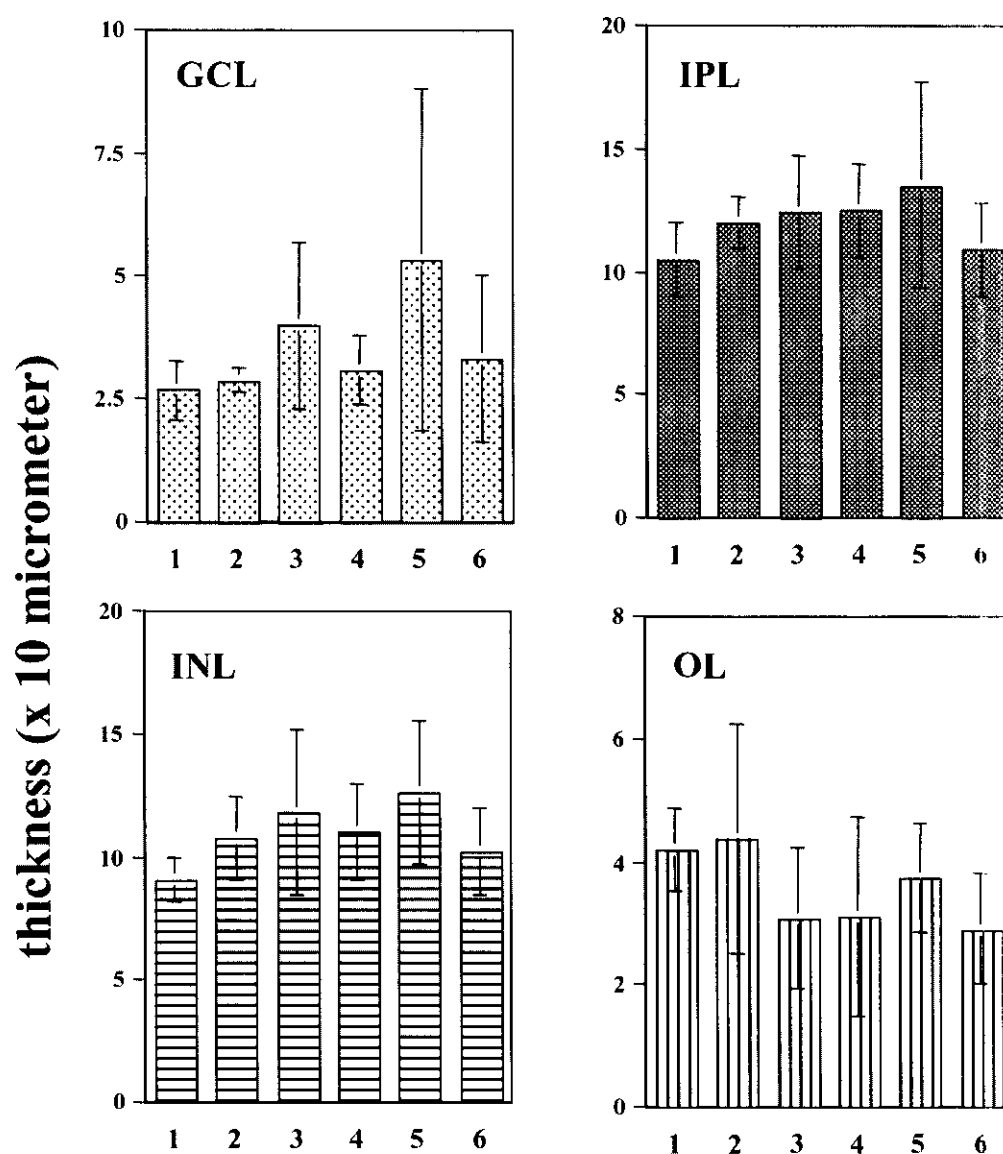


GCL;ganglion cell layer,IPL;inner plexiform layer,
INL;inner nuclear layer,OL;outer layer(ONL+OPL+OS)

1; vehicle(NaCl) 2; nicardipine 3; diltiazem
4;vehicle(ethanol) 5; nilvadipine 6; nifedipine

図 1 カルシウム拮抗剤の網膜組織に対する効果

図 2

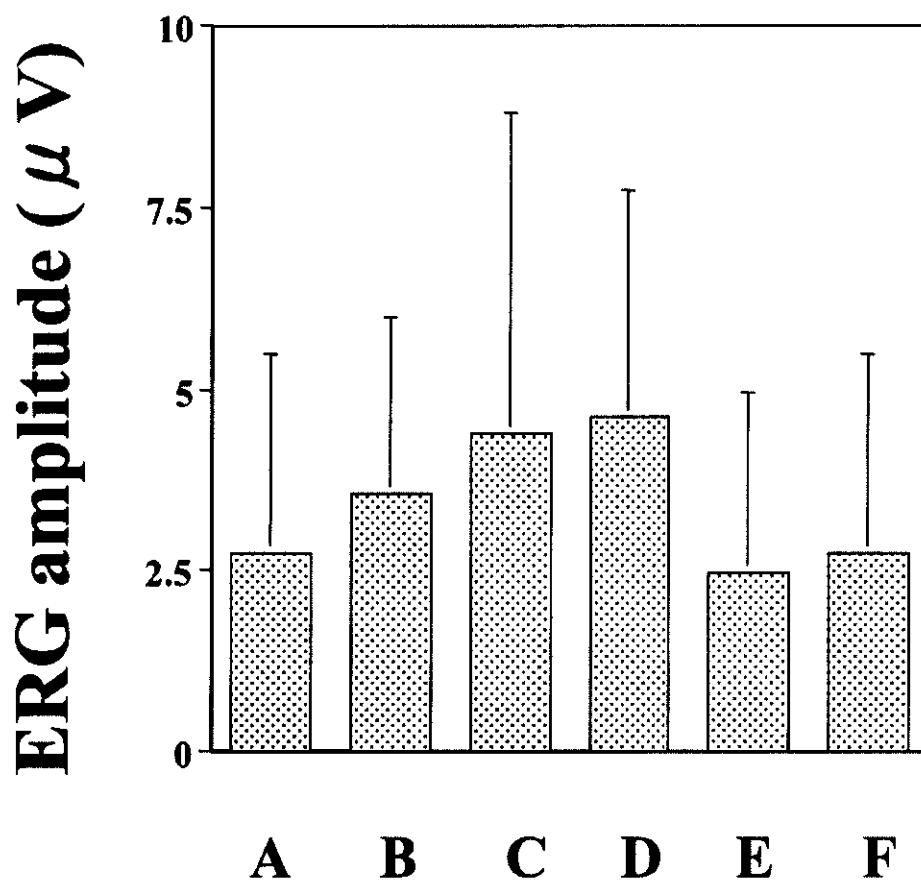


GCL; ganglion cell layer, IPL; inner plexiform layer
 INL; inner nuclear layer, OL; outer layer

1; saline, 2; nicardipine, 3; diltiazem
 4; EtOH/water/polyethylene glycol, 5; nilvadipine
 6; nifedipine

図 2 図 1 の統計学的検討

図 3



A: Control for B and C
B: Nilvadipine
C: Nifedipine
D: Control for E and F
E: Nicardipine
F: Diltiazem

図3 カルシウム拮抗剤の網膜機能に対する効果

RCS ラットの網膜変性の病態

Morphology of retinal degeneration in Royal College Surgeons rat

大黒 浩、山崎仁志、目時友美、佐藤元哉、柳橋さつき、中沢 満
弘前大学眼科学教室

Hiroshi, Ohguro, Hitoshi Yamazaki, Tomomi Metoki, Motoya Satou,
Satsuki Yanagihashi, and Mitsuru Nakazawa
Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine

目的：RCS ラットは最も広く研究に使われている実験動物であり、網膜色素変性を始めとする遺伝性網膜色素変性における分子病態の理解のために使われている。今回我々は、種々の Ca 拮抗剤の RCS ラット網膜変性に対する効果について評価し、その病態について検討した。

方法：臨床で用いられる Ca 拮抗剤、すなわちジルチアゼム・ニカルジピン・ニルバジピン・ニフェジピンを RCS ラットの腹腔内に投与し形態学的、機能的分析を行った。

結果：これら Ca 拮抗剤のうちニルバジピンの投与だけが、RCS ラットの網膜変性の初期段階において形態学的な保護作用を示し、また ERG において機能的な保護作用を示した。RT-PCR 法および免疫蛍光顕微鏡においてニルバジピンを投与したラットの網膜ではロドプシンキナーゼ・ α -A-クリスタリンの発現が有意に増強しており、Caspase 1 and 2 の発現は抑制されていた。

結論：ニルバジピンは RCS ラットにおいて有意な視細胞保護作用があり、網膜色素変性症患者の治療となり得る。

Purpose: The Royal College of Surgeons (RCS) rat is the most extensively studied animal model for understanding the molecular pathology of inherited retinal degeneration, such as retinitis pigmentosa (RP). Here, purpose of the present study is to evaluate drug effects of several kinds of Ca^{2+} antagonist on the retinal degeneration of RCS rats.

Methods: Several kinds of Ca^{2+} antagonists, diltiazem, nifedipine, nilvadipine or nifedipine, were intraperitoneal administrated and thereafter retinal morphology and functions were analyzed.

Results: We found that systemic administration of only nilvadipine caused preservation of retinal morphology and functions of electroretinogram responses in RCS rats during the initial stage of the retinal degeneration. Studies using immunohistochemistry, RT-PCR and Western blotting revealed significant enhancement of rhodopsin kinase and α -A-crystalline expressions in the retina of nilvadipine treated rats.

Conclusion: Based upon these data, it is strongly suggested that nilvadipine is beneficial for the preservation of photoreceptor cells in RCS rats and can potentially be used to treat some RP patients.

キーワード：網膜ジストロフィー、網膜変性、網膜電位図、ロドプシンリン酸化、RCSラット

Key Words . retinal dystrophy, retinitis pigmentosa, electroretinogram, rhodopsin phosphorylation, RCS rat

導 入

RP (Retinitis Pigmentosa) は夜盲、輪状暗点、網膜の骨小体様色素沈着を特徴とした遺伝性網膜変性であるが、効果的な治療法は確立されていない。RP の実験モデルとして RCS ラットがしばしば用いられるが、その網膜変性の分子病態に関しては、主に、RCS ラットの RPE (Retinal Pigment Epithelial) から Rod Outer Segment (ROS) へ debris が蓄積し食食作用が消失するということが関与していると考えられている^{1)~3)}。最近の研究で、D'Cruz らは、RCS rat の網膜変性の原因として、receptor tyrosine

kinase Mertk の mutation を発見した。この遺伝子は人においてもみられるため、この実験モデルにおいて治療効果が得られれば、網膜変性疾患への応用が期待される。RCS ラットの ROS において、オプシン・アレスチン・外節蛋白のリン酸化レベルで様々な変化が生じていることが発見され^{4)~6)}、それが ROS において光変換経路 (phototransduction pathway) の quenching に影響を及ぼしている可能性が考えられる。以上のことから、低レベルのロドプシンリン酸化は、桿体視細胞の光変換経路で misregulation を引き起こし、結果として網膜変性が生じるというこ

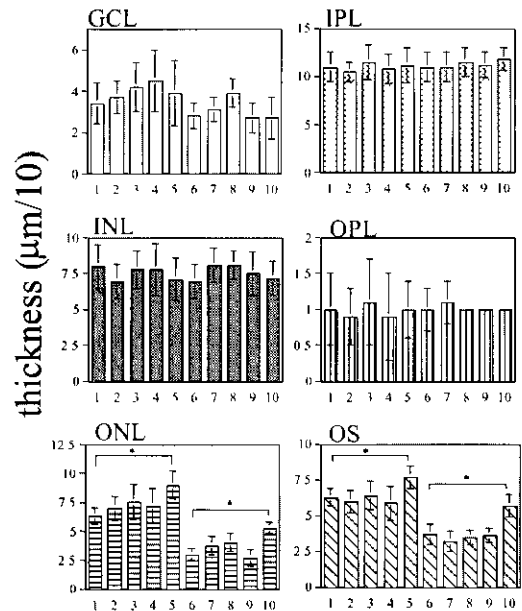
とが推測される。網膜特異的Ca結合蛋白であるリカバリンは、Ca依存的にロドプシンキナーゼによるロドプシンのリン酸化をnegativeに制御している⁷⁾、Ca拮抗剤により細胞内へのCa流入を低下させ、リカバリンによる制御作用を抑制することは、RCS ratsの視細胞の保護に有効である可能性を示唆する。最近Frassonらは近年、Caチャンネル拮抗剤であるジルチアゼムが、rd mouseにおいて桿体細胞を救済したことを報告している⁸⁾。以上のデータから、細胞内Ca濃度の制御は、RPやその動物モデルにおいて進行性の網膜変性を阻止するための治療になり得ると考えられる。

この仮説を証明するために、生後3週から視細胞の変性が始まるRCS rats(3週令)に、臨床で用いられる様々なCa拮抗剤を腹腔内投与した。そして、網膜機能はERGで評価し、光学顕微鏡・免疫組織化学・電子顕微鏡による組織学的検討も行った。

結果

RCS ratsにおけるCa拮抗剤の効果を調べるために、臨床で用いられる4種類のCa拮抗剤、すなわちジルチアゼム・ニフェジピン・ニカルジピン・ニルバジピンとその基材を3週令のRCS ratsに連日、2週間腹腔内投与し、網膜各層の厚さを比較した。Fig.1に示すように、ジルチアゼム・ニフェジピン・ニカルジピン投与例では、5週令において網膜形態に効果は示されなかった。しかし対照的に、ニルバジピン投与例ではcontrolに比べ、網膜層が4、5週令で優位に厚かった。このことから、RCS ratsにおいてニルバジピンは網膜変性に伴う網膜障害を保護する効果があることが推測される。電子顕微鏡による観察では、未治療群の網膜は、視細胞外節の破壊が見られたのに対し、ニルバジピン投与した網膜で

control



1-5; 4 w, 6-10; 5 w
1, 6; vehicle, 2,7; diltiazem, 3,8; nifedipine, 4, 9, nicardipine, 5, 10; nilvadipine

Fig. 1

は、その構造はより保たれていた (Fig.2)。また、未治療網膜に比べてニルバジピン投与群の網膜では、シナプスとシナプスリボンの保護が見られた。

これらの形態学的な違いは、Fig.3に示すように、ニルバジピン投与群と未治療群間にERGで見られる網膜機能の違いにも相関している。ニルバジピン投与群の4週令では、controlに比べてa波およびb波の振幅が有意に大きかった ($P=0.001$)。しかしながら、ほかのCa拮抗剤はERG反応に影響を及ぼさなかった。以上より、ニルバジピンの腹腔内投与は網膜形態および機能を保護するということが強く示唆された。

免疫蛍光顕微鏡において、ニルバジピン投与例では、RCSラットで通常減少しているロドプシンキナーゼや α -A-クリスタリンの発現が4週令、

Nilvadipine投与



Fig. 2

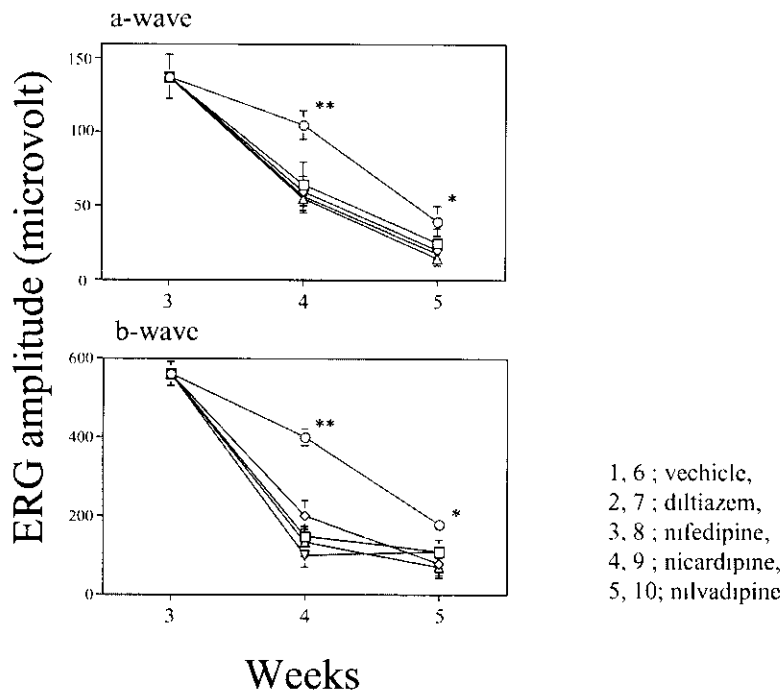


Fig. 3

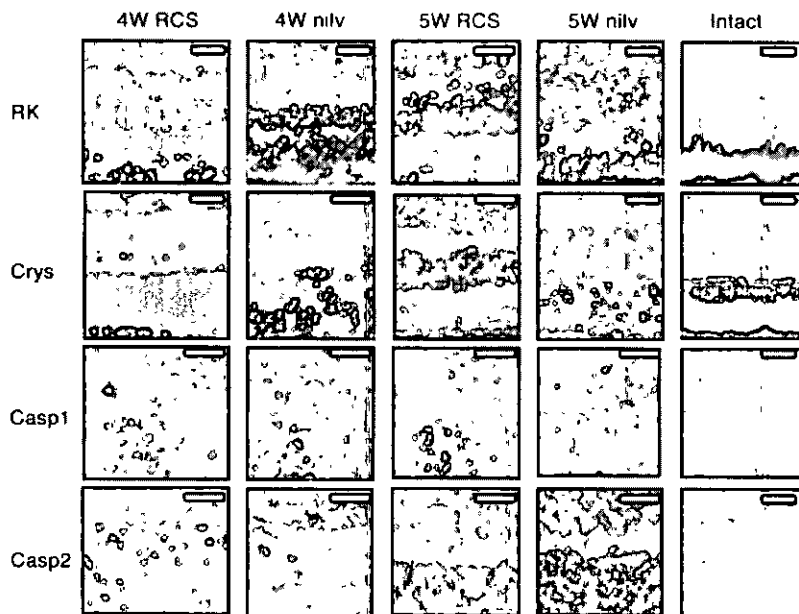


Fig. 4

5週令が多かった (Fig.4)。また、caspase 1 and 2 に対する免疫染色性は、4週令の未治療 RCS rats 網膜・外顆粒層の細胞質において発見されたが、ニルバジピン投与例では外顆粒層で陽性細胞は少なかった。5週令においては、caspase 1 and 2 に対する免疫染色性は、ニルバジピン投与例でも未治療 RCS rats でも Normal intact rats でも発見されなかった。これらのデータは RT-PCR においても一致していた。

考 察

この研究で我々は、Ca 拮抗剤であるニルバジ

ピンの腹腔内投与が RCS rats の網膜変性に対して視細胞の保護効果があることを発見した。1) 形態学的に、光学顕微鏡で有意に網膜層が厚くなっており、電子顕微鏡では視細胞外節の構造、外顆粒層のシナプス・シナプスリボン形態の保護が観察された。2) 機能的に、ERG で a 波・b 波の振幅が保護されていた。3) ロドプシンキナーゼや α -A-クリスタリンの発現の保護が、免疫組織化学・RT-PCR で認識された。

高血圧に対して広く治療に用いられている Ca 拮抗剤は、細胞内への Ca の流入を阻止し、平滑筋細胞を弛緩させ、さまざまな臓器の局所的な血流を増加させる。報告によるとニルバジピンは、高血圧がない場合、全身の血圧に対して最小限の効果を示す dihydropyridine Ca 拮抗剤であり⁹⁾、犬の実験ではニフェジピン・ニカルジピンよりもより血流を増加させており¹⁰⁾、ウサギの実験では、視神経乳頭血流および血流速度は脈絡膜・網膜と同様に増加していた¹¹⁾。ゆえにニルバジピンは神経保護として機能していることが考えられており、事実、脳梗塞のような中枢神経系の疾患発症後の神経細胞死に対する保護のために臨床的に使われている。また、いくつかの Ca 拮抗剤は緑内障患者の視野欠損の進行を効果的に遅らせることも推測されている。特に、正常眼圧緑内障に対する血管拡張作用による眼血流の増加が注

目されている^{12), 13)}。これらのことから、ニルバジピンは脳血液関門を通過できるため、その腹腔内投与により網膜組織をはじめとした中枢神経系に作用し、細胞保護レベルにまで達できると考えられる。

我々の今回の研究で、ニルバジピンは RCS rats において網膜が変性している間、視細胞の形態・機能を保護していた。同様に Mertk に mutation があるという点で、RP 患者と一致しているため、今後さらなる検討を加えることにより、ニルバジピンの効果が臨床的に RP の治療に応用される可能性があると考えられる。