

うち、ハンフリー視野にて緑内障変化を認めたものはA群では23例中1例のみであり、視野異常はないが眼底検査で緑内障性視神経乳頭陥凹と判定された症例が1例あった。一方、B群4例では乳頭にnotchingなどの局所の変化を有しており、全例で視野異常が検出された。以上のことから、無散瞳眼底写真判定だけでは、乳頭陥凹を過大評価する症例、すなわち偽陽性が多く含まれると考えられた。

また、視野欠損を認めた48眼についての視野進行度を表4に示す。全体ではstage1が4眼、stage2が17眼、stage3が6眼、stage4が2眼、stage5が15眼であり、分類不能の非典型的変化が4眼であった。非典型的変化は、近視に伴う傾斜乳頭に合併するものが多かった。Stage3以上の進行例にもかかわらず、自覚症状のない例が17例23眼あり、今回の2次検診で緑内障と診断された症例うちの42.5%に相当した。

考 察

1988～1989年に本邦で実施された緑内障疫学調査では、40歳以上に占める緑内障有病率は3.56%と報告された。この調査において、1次検査の眼圧測定にて緑内障疑いと判定されたのは1.6%であるのに対し、無散瞳カメラによる緑内障判定では5.47%が緑内障疑いと判定された¹⁾。また、2000～2001年に施行された多治見スタディの結果では、40歳以上に占める緑内障有病率は約5.78%であり、開放隅角緑内障のうち9割以上が正常眼圧緑内障であったと報告されている。今回検討した2次検診では、眼圧が22mmHg以上であった症例は3例のみであり、その他82例は正常眼圧であった。健診による緑内障スクリーニングには、眼圧よりも視神経乳頭の評価の方が重要であり²⁻¹⁰⁾、早期変化を捉えるためにもNFLDを含めた詳細な視神経乳頭観察の必要性が改めて確認された。また、緑内障性視野変化は緩徐に進行するため自覚症状に乏しく、今回の結果でもstage3以上の視野進行例にもかかわらず、自覚のない症例が42.5%を占めた。

緑内障の確定診断には視野異常を証明することが不可欠であるが、1次スクリーニングとして全例に視野検査を行うことは測定時間が長く困難である¹⁾。近年、Frequency Doubling Technology 検査(以下FDT)が、短時間で測定できることから、緑内障スクリーニングとして注目されている^{12,13)}。しかしながら、スクリーニング機器としてはやや高価であり、緑内障のごく早期の小さな暗点が検出できず検出率が劣る点¹⁴⁾、またFDTの異常が必ずしもハンフリー視野と一致しない点^{12,13)}など、まだ一般検診に普及するには至っていない。現時点では、緑内障の確実な発見のためには眼底検査、乳頭観察をあわせて行う必要がある^{12,13)}。そこで、無散瞳眼底撮影による写真判定が簡便であり、いわゆる人間ドックを含めた1次緑内障スクリーニングとして

広く普及しているのが現状である。しかし、無散瞳眼底写真では乳頭の立体観察ができないために、びまん性の陥凹や乳頭の局所性変化が観察困難なことがある¹⁾。また今回の結果では、眼底写真で異常と判定された症例でも、2次検査の結果、視神経乳頭や視野には緑内障性変化を認めなかったものが21例存在し、無散瞳眼底写真の撮影条件によっては乳頭蒼白部が誇張されて、視神経乳頭変化を過大評価してしまう可能性も示唆された。

今回の検討において、無散瞳眼底写真判定に加え眼科専門医による無散瞳眼底検査を施行することによって、検査後陽性確率は31.4%から70.6%に上昇し、オッズ比は5.22であった。すなわち、写真判定により緑内障が疑われた症例に対しては、直像鏡による乳頭観察を加えるだけで診断効率が向上した。これは、C/D比が0.6以下の偽陽性例が減少し、notchingなどの乳頭局所変化を確認できるために、より特異度が上昇した結果と考えられた。

以上のように、従来の無散瞳眼底写真判定に加え、眼科専門医が直像鏡による視神経乳頭評価を加えることにより、更に緑内障スクリーニングの診断効率が格段に上昇することが確認された。しかしながら、緑内障スクリーニングのために検診者全員に眼科医が直像鏡検査を行うことは、時間と効率の面からみて現実的ではない。そこで、今回のB群のように、まず眼底写真判定を行い、疑わしい例には企業診療所などを利用して眼科医が直像鏡にて視神経評価を行うことが、検診効率を高めるために有効であると考えられる。

本論文の要旨は、第39回北日本眼科学会にて発表した。

文 献

- 1) Shiose Y, Kitazawa Y et al: Epidemiology of glaucoma in Japan - A nationwide glaucoma survey. *Jpn J Ophthalmol* 35: 133-155, 1991.
- 2) 塚原重雄, 細田源浩: 緑内障の疫学 失明原因第3位. *あたらしい眼科* 16: 893-898, 1999.
- 3) 塩瀬芳彦, 小室邦子他: 新しい緑内障集団検診システム. *臨眼* 34: 509-517, 1980.
- 4) 東 由直, 引地泰一他: 人間ドックにおける後極部眼底写真撮影の意義. *臨眼* 50: 375-377, 1996.
- 5) 雨宮哲士, 関 希和子他: 当院人間ドックにおける緑内障検診の特異性. *健康医学* 12: 92-94, 1997.
- 6) 木村奈都子, 林 裕美他: 人間ドックにおいて眼底所見から正常眼圧緑内障が疑われた症例について. *臨眼* 92: 516-519, 1998.
- 7) 宮内 修, 伊藤 彰他: 人間ドックにおける緑内障のスクリーニングテスト. *臨眼* 52: 1151-1154, 1998.
- 8) 日比野佐和子, 大島安正他: 人間ドックにおける緑内障検診の検討. *眼紀* 52: 652-655, 2001.
- 9) 岡田真弓, 塚本秀利他: 広島県御調町における眼科検診. *臨眼* 56: 871-873, 2002.
- 10) 荻原智恵, 奥川加寿子他: 人間ドックにおける緑内障の有病率. *あたらしい眼科* 19: 521-524, 2002.
- 11) 久紫哲徳: 根拠に基づく医療 EBMの実践と教育の方法. 79-156. *オーシーシー・ジャパン*. 大阪, 1999.

- 12) 松原悦子, 岩瀬愛子他: Frequency Doubling Technology スクリーニング検査の緑内障視野異常検出能力の検討. あたらしい眼科 19: 349-351, 2002.
- 13) 斎藤 守, 山城博子他: Frequency doubling technology による緑内障スクリーニング検査の有用性. 日眼会誌 105: 20-23, 2001.
- 14) 山城博子, 田中麻以他: Frequency Doubling Technology の極早期緑内障性視機能異常検出能力の検討. 日眼会誌 105: 488-493, 2001.

(2003年5月23日受付)

Original Paper

Ophthalmic
ResearchOphthalmic Res 2003;35:345–350
DOI: 10.1159/000074075Received: April 29, 2002
Accepted after revision: September 16, 2003

Variants of the Myocilin Gene in Japanese Patients with Normal-Tension Glaucoma

Kanako Izumi^{a,b} Yukihiro Mashima^b Minoru Obazawa^a Yuichiro Ohtake^b
Tomihiko Tanino^b Hiroshi Miyata^b Qiang Zhang^b Yoshihisa Oguchi^b
Yasuhiko Tanaka^a Takeshi Iwata^a

^aNational Tokyo Medical Center, National Institute of Sensory Organs, Meguro-ku, and

^bDepartment of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Japan

Key Words

Myocilin · Polymorphism · Normal-tension glaucoma · Primary open-angle glaucoma · Gene expression · COS-1 cell

Abstract

Myocilin (*MYOC*) mutations are associated with juvenile- and adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG). The purpose of this study was to determine whether *MYOC* gene mutations are associated with normal-tension glaucoma (NTG). The prevalence of *MYOC* mutations was determined in 80 Japanese NTG patients and 100 control subjects. In addition, the expression of mutant *MYOC* was determined by transforming COS-1 cells with five myocilin variants (R158Q, D208E, I360N, A363T, and I477S) and examining whether myocilin was present in the cultured cells and/or the culture medium by western blotting. Six different nucleotide sequence variants, R46Stop, R76K, R158Q, D208E, A488A, and one in the 3' non-coding region, were identified in 80 NTG patients. The differences in the frequencies of these sequence changes in NTG patients did not differ significantly from those in 100 control Japanese subjects. COS-1 cells

transfected with the wild type, R158Q, or D208E variants secreted myocilin into the culture medium. On the other hand, the detected myocilin was significantly reduced in the medium of cells transfected with the I360N, A363T, or I477S variants that were previously identified as mutations for POAG. Definitive evidence of *MYOC* variants associated with NTG was not found.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

Introduction

Primary open-angle glaucoma (POAG) is an important cause of blindness worldwide. The disease is characterized by visual-field changes corresponding to the excavation of the optic disk and is usually associated with an elevation of the intraocular pressure (IOP). Although the pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy is poorly understood, it is generally accepted that the IOP is a major risk factor. In eyes with normal-tension glaucoma (NTG), there is no evidence for an increase in the IOP over 21 mm Hg at any time. It has been suggested that vascular insufficiencies are deeply involved in the development and progression of NTG [1–3].

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel
0030-3747/03/0356-0345\$19.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/ore

Takeshi Iwata
National Tokyo Medical Center
National Institute of Sensory Organs
2-5-1 Higashigaoka, Meguro, Tokyo 152-8902 (Japan)
Tel./Fax +81 3 34111026, E-Mail iwataakeshi@kankakuki.go.jp

There is strong evidence that genetic factors play a role in the pathogenesis of glaucoma, and several chromosomal loci involved with POAG have been identified. The first of these loci, the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response (TIGR), was shown to be the product of the glaucoma gene, *GLCIA*, which was mapped to chromosome 1q [4]. At the time of that report, we cloned a novel protein in the photoreceptors of the retina that had some sequence homology to non-muscle myosin and olfactomedin, and called this protein myocilin [5]. This protein was later found to be identical to TIGR. The *GLCIA* gene is now known as the myocilin (*MYOC*) gene. Mutations in the *MYOC* gene have been more commonly associated with juvenile-onset POAG (36% of patients with this disease) [6] than with adult-onset POAG [6–8] (3–5% with adult onset). The role of myocilin and the mechanism through which the mutations in this gene cause glaucoma remains unknown. Approximately 50 mutations in the *MYOC* gene have been described that probably cause glaucoma [6–10].

Myocilin, a 57-kD protein, is encoded by a gene with three exons and is 504 amino acids in length [11]. The third exon of the *MYOC* gene encodes a peptide sequence that is homologous to olfactomedin, and the vast majority of *MYOC* mutations in patients with POAG have been identified in the olfactomedin homology domain [6–10]. On the other hand, some mutations in the *MYOC* gene have been reported to be associated with NTG patients [9, 12, 13], although Clark et al. [14] have suggested that coding sequence variations in the *MYOC* gene were not commonly involved in NTG.

In Japan, the prevalence of glaucoma is approximately 3.5% in patients over 40 years old, and the incidence of POAG is 0.58% and of NTG 2.04% [15]. The prevalence of NTG in the Japanese population is high compared with that in other populations. We have evaluated the potential pathogenicity of mutations of the *MYOC* gene in patients with NTG in two ways. First, we compared the prevalence of mutations in the *MYOC* gene in NTG patients and in control subjects. And second, we determined the expression of mutant *MYOC* by transforming these mutants into COS-1 cells and measuring the amount of myocilin in the medium or in the cell. These experiments were performed based on the report that normal myocilin is secreted from cultured cells, but very little or no myocilin is secreted from cells expressing the mutant forms of myocilin associated with POAG [16].

Materials and Methods

Patients

Blood samples were collected from 80 unrelated NTG patients regardless of their family history at the Keio University Hospital. All subjects signed an informed consent after an explanation of the procedures to be used and the purpose of the studies.

All of the NTG patients were diagnosed by two glaucoma specialists (Y.O. and T.T.) according to the following criteria: presence of typical optic disk damage with glaucomatous cupping and loss of the neuroretinal rim; reproducible visual field defect compatible with glaucomatous cupping; untreated peak IOP that was ≤ 21 mm Hg at all times, including both the 5 baseline measurements and the diurnal testing (every 3 h from 6.00 to 24.00 h); open drainage angles on gonioscopy, and the absence of any secondary cause for glaucomatous optic neuropathy, such as a previously raised IOP following trauma, or a period of steroid administration or uveitis. The demographic features of 80 NTG patients were: 44 men and 36 women, mean age at the initial diagnosis was 54.0 ± 12.8 years, mean highest diurnal IOP was 16.3 ± 2.8 mm Hg (range 11–21), and the mean values of the mean deviation (MD) and corrected pattern standard deviation (CPSD) on Humphrey perimetry (program 30-2) were -7.59 ± 6.98 dB and -6.52 ± 4.87 dB, respectively.

Control blood samples were obtained from 100 Japanese individuals who had an IOP below 20 mm Hg, had no glaucomatous disk changes, and no family history of glaucoma.

Mutation Screening of the *MYOC* Gene

Genomic DNA was prepared by proteinase K-phenol-chloroform extraction. The methods used to detect mutations in the *MYOC* gene have been described [9]. Mutations in the *MYOC* gene were first screened for by PCR-SSCP analysis using a standard protocol with specific primers. Samples with abnormal mobility were further analyzed by direct sequencing of the PCR products with an automated DNA sequencer (373A, Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) using a Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ., USA).

Myocilin Constructs

Human *MYOC* cDNA was obtained by RT-PCR amplification (Super Script One Step RT-PCR System, Invitrogen Japan, Tokyo, Japan) of cDNA generated from total RNA isolated from human trabecular meshwork cells. Human *MYOC* cDNA was cloned into vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen), and the following variants were generated with the Quick Change Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, Calif., USA): R158Q (present study), D208E (present study), I360N (pathologic mutant for POAG [9]), A363T (pathologic mutant for POAG [9]), and I477S (pathologic mutant for POAG [16, 17]) according to the manufacturer's instructions. The sense-strand primer sequences used for mutagenesis (underlined letters) were:

R158Q:
5'-GGAGGAAGAGAAGAAGCAACTAAGGCAAGAAAATG-3'
D208E:
5'-CGTGAATTTGGAGACTTTGGCCTTCCAGG-3'
I360N:
5'-GGCTGAGAAGGAAACCCTGGAGCTGGCTA-3'
A363T:
5'-GGAAATCCCTGGAACTGGCTACCACGGACA-3'
I477S:
5'-AAGTACAGCAGCATGAGTGACTACAACCCCCTG-3'

R76Lys has already been reported as a polymorphism worldwide. The clinical phenotype of R46Stop is not consistent with the genotype, and this mutation may not be associated with glaucoma [18]. Thus, we did not examine these two sequence variations for the expression of myocilin.

Cell Culture, Myocilin Transfection, and Sample Preparation

COS-1 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. For transient transfection, COS-1 cells were harvested from 175 cm² flasks (Falcon 3111) by trypsinization, pelleted by centrifugation, and washed twice in 10 ml phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), and resuspended in PBS at a concentration of 1×10^7 cells/ml. Ten micrograms of plasmid DNA (pcDNA3.1(+)) were added to 500 μ l of COS-1 cells and electroporated in a 0.4-cm cuvette with a Gene Pulser II Electroporator (Nippon BioRad Laboratories, Yokohama, Japan) set at 500 V, 100 μ F. Electroporated cells were resuspended in 2 ml of medium and plated into 75 cm² flasks (Falcon 3108) at a concentration of 5.0×10^7 cells. The medium was changed after 24 h. Serum-free medium was added 12 h prior to cell and medium collection. The cells were harvested after 60 h. Five milliliters of serum-free medium was concentrated by centrifugation in a Centricon 50 spin column (Millipore, Bedford, Mass., USA) to achieve a 100-fold concentration. Samples were stored at -80°C .

The transformed COS-1 cells were rinsed with PBS and cellular proteins were extracted in 2.4 ml of mammalian protein extraction buffer (M-PER, Pierce, Rockford, Ill., USA) containing 0.4 ml of protease inhibitors (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan). The cell extract was centrifuged at 3,000 rpm for 5 min, and the supernatant was stored at -80°C . The protein concentration was determined with the Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce).

RNA Isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated from cultured COS-1 cells with a total RNA isolation kit (RNA-Bee-RNA Isolation Reagent; TEL-Test, Friendswood, Tex., USA). Total RNA samples were digested by RNase-free DNase (Roche Diagnostics, Japan) to minimize the risk of genomic DNA contamination. First-strand cDNA was synthesized using random primers (Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR; Invitrogen Japan).

PCR was performed using 1 μ g of single-strand cDNA with 2.5 U *Taq* DNA polymerase in a volume of 50 μ l. After predenaturation at 95°C for 5 min, 25 cycles were performed including denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 65°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, followed by 1% agarose gel electrophoresis. The primers used were: 5'-ACACAGGCACAGGTATCAGCAAGA-3' (sense primer) and 5'-AAGTTGTCCAGGCAAAGAGCTT-3' (antisense primer). Ribosomal RNA 18S was examined as a control. The primers used were: 5'-TTCGGAAGTGGCCATGAT-3' (sense primer) and 5'-TTCGCTCTGGTCCGCTCTG-3' (antisense primer).

SDS-PAGE and Western Blot

SDS-PAGE and Western immunoblotting of transfected COS-1 cells were performed. Fifteen-microliter samples of COS-1 medium or cell extract were applied to 12% polyacrylamide gels. Proteins were transferred to Protran BA85 Cellulosenitrat (Schleicher & Schuell, Dassel, Relliehausen, Germany), blocked for 1 h with the blocking solution containing 10% Milk Diluent/Blocking Solution

(KPL, Gaithersburg, Md., USA) and 0.1% Tween-20 in phosphate buffer saline (pH 7.4). The membrane was probed with a rabbit polyclonal antihuman myocilin peptide antibody 4381R (1 μ g/ml). This anti-human myocilin antibody was generated against peptide sequence TRDTARAVPPGSREVST corresponding to positions between amino acid 188 and 204. The peptide antibody was initially described by Karali et al. [19]. The specific signal was detected by incubation of antirabbit IgG HRP secondary antibody (New England BioLabs, Beverly, Mass., USA) followed by a chemiluminescence reaction with Luminol reagent A and peroxide reagent B as recommended by the manufacturer (New England BioLabs) and made visible with chemiluminescence imager (Lumi-Imager F1, Roche Applied Science, Tokyo, Japan).

Antibody specificity was confirmed by absorbance of antibody by antigen peptide before Western blotting (fig. 2c). Antibody (10 μ g) was absorbed with 1,000-fold molar ratio of purified antigen peptide (TRDTARAVPPGSREVST) for 1 h at room temperature in 10 ml of blocking solution before incubation with the blot. The absorbed antibody was tested by Western blotting against secreted wild-type myocilin mixture. Further experimental conditions were the same as described above.

Results

Screening of MYOC in NTG Patients

We identified six different sequence variations of *MYOC* in the patients with NTG (table 1). Variants in codon 46 (R46Stop), codon 158 (R158Q), and codon 488 (A488A) were not found in the 100 normal controls. The frequency of other sequence changes (R76K, D208E, and 3' non-coding) in NTG patients did not differ significantly from the frequencies in the control subjects.

Expression of MYOC mRNA in COS-1 Cells

No differences in the *MYOC* transcripts were found between the wild type and variants as compared with those of ribosomal 18S mRNA as an internal standard (fig. 1).

Expression of Myocilin in COS-1 Cells and Medium

Myocilin was expressed in COS-1 cells transformed by wild-type *MYOC*, or by R158Q and D208E variants (fig. 2a, lanes 1–3). A significant lower expression of myocilin was observed in cells transformed with variants I360N, A363T, and I477S (fig. 2a, lanes 4–6). Myocilin was secreted into the medium of COS-1 cells that were transfected by the wild-type *MYOC*, and by R158Q, or D208E variants (fig. 2b). On the other hand, the secreted myocilin was significantly lower in the medium of COS-1 cells that were transfected by variants I360N, A363T, and I477S.

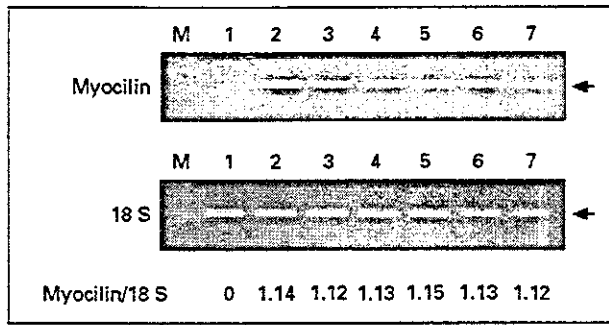


Fig. 1. Myocilin RNA expression in transfected COS-1 cells. 1: Negative control (no transfection); 2: wild type; 3: R158Q; 4: D208E; 5: I360N; 6: A363T; 7: I477S.

Fig. 2. Western blot analysis of intracellular and secreted myocilin from wild-type and mutant transfected into COS-1 cells. Intracellular (a) and secreted (b) myocilin was detected by anti-human myocilin peptide antibody. c Specificity of the antibody was tested by absorption test using antigen peptide. Details described in Materials and Methods. Lane 1: wild type; 2: R158Q; 3: D208E; 4: I360N; 5: A363T; 6: I477S; 7: secreted wild type; 8: secreted wild-type + antigen peptide.

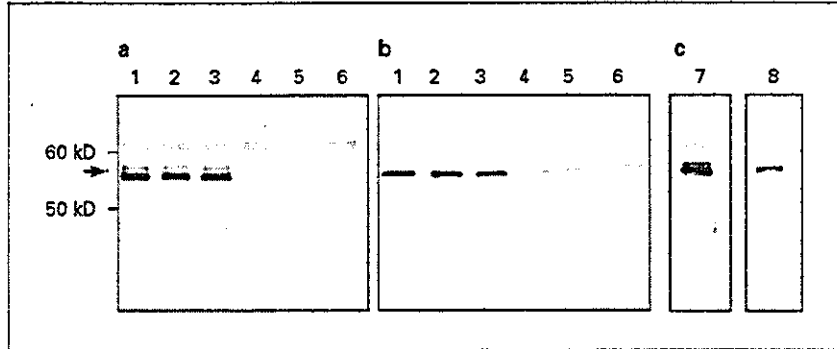


Table 1. Number of study subjects with sequence alterations detected in the *MYOC* gene

Sequence alteration	NTG patients (n = 80)	Control subjects (n = 100)	p values ¹
R-46-Stop (136 C to T)	2 (2.5)	0 (0)	0.20
R-76-K (227 G to A)	7 (8.8)	3 (3)	0.11
R-158-Q (473 G to A)	2 (2.5)	0 (0)	0.20
D208-E (624 C to G)	3 (3.8)	5 (5)	0.50
A 488-A (1464 C to T)	1 (1.3)	0 (0)	0.45
3'non-coding (1515 + 73 G to C)	3 (3.8)	1 (0)	0.24

Figures in parentheses are percentages.
¹ Fisher's exact probability test.

Co-transfection of COS-1 cells with wild type and one mutant *MYOC* (I360N) led to the suppression of intracellular and extracellular secretion of myocilin (fig. 3).

The antibody used for this experiment was tested for specificity by an antigen peptide absorbance test (fig. 2c). The antigen peptide significantly reduced the myocilin signal in Western blotting, demonstrating the specificity of the antibody. The secondary antibody alone did not show any signals.

Discussion

Myocilin is expressed in the trabecular meshwork, ciliary body, retina, and the optic nerve head [14, 19, 20]. In recent studies, intracellular as well as extracellular expression of myocilin has been reported in astrocytes and lamina cribrosa cells of the optic nerve head [14, 21]. These observations suggest the possible involvement of myocilin in the glaucomatous damage of the optic nerve head.

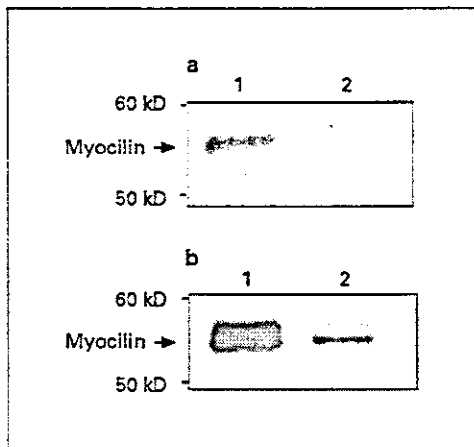


Fig. 3. Western blot analysis of intracellular and secreted myocilin from wild type and mutant co-transfected into COS-1 cells. Wild-type myocilin and equal amount of variant I360N were mixed and transfected into COS-1 cells. The intracellular (a) and secreted (b) myocilin was detected by anti-human myocilin peptide antibody. 1: wild type, 2: co-transfection (wild type: I360N = 1:1).

Thus, the question arose whether mutations in the *MYOC* gene were also associated with NTG. The Q368stop [12] and T293K [22] variant have been reported in patients with NTG. On the other hand, Clark et al. [14] suggested that coding sequence variations in myocilin were not commonly involved in the NTG phenotype. However, they reported three polymorphisms, L215P, T256M, and W286R, in 3 of the 307 NTG patients, while none was detected in 193 controls [14]. These variants may possibly be associated with the NTG phenotype.

We have identified 6 variants of *MYOC*, one of which did not cause an amino acid substitution (A488A), and another existed in a non-coding region. R76K is considered to be a non-disease-causing polymorphism worldwide [7, 8, 23]. The R46Stop variant was identified in two Japanese NTG patients, and in none of the normal Japanese controls. In the Chinese population, subjects with a heterozygous R46Stop had POAG or were normal, and those with a homozygous R46Stop did not have glaucoma [18]. This mutation was also detected in 4 of 132 normal Chinese controls. In the Korean population, a patient with a homozygous R46Stop had severe juvenile-onset POAG [24], and this mutation was also detected in 1 of 106 normal Korean controls. Thus, the clinical phenotype of R46Stop is not consistent with the genotype, and the reduction in the amount of myocilin expression associat-

ed with this mutation may not necessarily cause glaucoma.

Variant R158Q was found in 2 Japanese NTG patients but not in the 100 control subjects in the present study. However, Mabuchi et al. [13] have previously reported this variant in 1 of 100 Japanese controls. Variant D208E was also found in Japanese control subjects. A group in the United States reported this variant as a possible disease-causing variant for glaucoma [23]. A statistically significant *p* value for these three sequence variations, R46Stop, R158Q, and D208E, was not obtained between NTG patients and controls. However, to clarify the prevalence of *MYOC* mutations in association with NTG, a large number of NTG patients and controls will be needed for a statistical study.

Jacobson et al. [16] demonstrated that myocilin was expressed in the cell and was secreted into the medium of ocular (trabecular meshwork) or non-ocular cells (COS-1) transformed with wild-type *MYOC* or a polymorphic variant (K398R), but one variant (G364V) showed limited secretion and others (Q368X, K423GE, Y437H, I477S) showed none. Myocilin was secreted from cultured cells but very little or no myocilin was secreted from cells expressing mutant forms of *MYOC* that are located in the olfactomedin-like domain and associated with POAG.

We have designed a simple functional test using the readily available COS-1 cell line to monitor myocilin secretion by the variant forms of *MYOC* found in patients with POAG or NTG. In the present study, five missense variants were examined for secretory function. Of the 5 *MYOC* variants, R158Q and D208E located in the myocilin-like domain were identified in patients with NTG; I360N and A363T located in the olfactomedin-like domain were identified in our previous study in Japanese patients with POAG [9], and the L477S variant was reported by Jacobson et al. [16] in a patient with juvenile-onset POAG [17]. L477S was used as pathological control for protein secretion.

In this functional test, the I360N, A363T, and L477S variants were non-secreting, while the R158Q and D208E variants secreted myocilin. The expression and secretion level of myocilin in variants R158Q and D208E were similar to those of the wild type myocilin. No myocilin accumulation was observed in cells transfected with non-secreting variants. When wild-type *MYOC* was co-transfected with mutant I360N, a significant reduction of wild type myocilin was observed in these cells. These observations led us to suggest that the mutant protein is not only degraded quickly in the cells but also influences the stability of the wild-type myocilin. A dominant-negative mech-

anism may have been the causative effect in I360N myocilin. Whether this is caused by dimerization of the wild type and mutant is under investigation.

It is well established that mutations in the olfactomedin-like domain of myocilin result in altered secretion [16]. Variants R158Q and D208E are not located in the olfactomedin-like domain, and R158Q is located in the myocin-like domain. However, it has not been established whether mutations in the myocin-like domain of myocilin result in altered secretion in vitro. Thus, impaired secretion is not the only mechanism involved in NTG, and there is a possibility that alterations in myocilin contrib-

ute to NTG along with other factors. Further investigations are needed to clarify the association of *MYOC* with NTG.

Acknowledgements

This research was supported by Research on Eye and Ear Sciences from Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. This research was also supported by Scientific Research (B) and Exploratory Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan. The authors thank Dr. Duco Hamasaki for editorial comments.

References

- Ishida K, Yamamoto T, Sugiyama K, et al: Disk hemorrhage is a significantly negative prognostic factor in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2000;129:707-714.
- Kamal D, Hitchings R: Normal tension glaucoma - a practical approach. *Br J Ophthalmol* 1998;82:835-840.
- Drance S, Anderson DR, Schulzer M: Risk factor for progression of visual field abnormalities in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2001;131:699-708.
- Stone EM, Fingert JH, Sheffield VC, et al: Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 1997;275:668-670.
- Kubota R, Noda S, Wang Y, et al: A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: Molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* 1997;41:360-369.
- Shimizu S, Lichter PR, Johnson AT, et al: Age-dependent prevalence of mutations at the *GLC1A* locus in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2000;130:165-177.
- Alward WLM, Fingert JH, Coote MA, et al: Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (*GLC1A*). *N Engl J Med* 1998;338:1022-1027.
- Fingert JH, Heon E, Liebmann JM, et al: Analysis of myocilin mutations in 1,703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet* 1999;8:899-905.
- Kubota R, Mashima Y, Ohtake Y, et al: Novel mutations in the myocilin gene in Japanese glaucoma patients. *Hum Mutat* 2000;16:270. Online Citation: Human Mutation, Mutation in Brief #355.
- Lam DS, Leung YF, Chua JK, et al: Truncations in the *TIGR* gene in individuals with and without primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1386-1391.
- Kubota R, Kudoh J, Mashima Y, et al: Genomic organization of the human myocilin gene (*MYOC*) responsible for primary open angle glaucoma (*GLC1A*). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:396-400.
- Mardin CY, Velton I, Ozbey S, et al: A *GLC1A* gene Gln368Stop mutation in a patient with normal-tension open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 1999;8:154-156.
- Mabuchi F, Yamagata Z, Kashiwagi K, et al: Analysis of myocilin gene mutations in Japanese patients with normal tension glaucoma and primary open-angle glaucoma. *Clin Genet* 2001;59:263-268.
- Clark AF, Kawase K, Stone EM, et al: Expression of the glaucoma gene myocilin (*MYOC*) in the human optic nerve head. *FASEB J* 2001;15:1251-1253.
- Shiose Y, Kitazawa Y, Tsukahara S, et al: Epidemiology of glaucoma in Japan - a nationwide glaucoma survey. *Jpn J Ophthalmol* 1991;35:133-135.
- Jacobson N, Andrews M, Sheffield VC, et al: Non-secretion of mutant proteins of the glaucoma gene myocilin in cultured trabecular meshwork cells and in aqueous humor. *Hum Mol Genet* 2001;10:117-125.
- Adam MF, Belmouden A, Binisti P, et al: Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of *TIGR* in familial open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet* 1997;6:2091-2097.
- Lam DSC, Leung YF, Chua JKH, et al: Truncation in the *TIGR* gene in individuals with and without primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1386-1391.
- Huang W, Jaroszeaski J, Caca-Prados M, et al: Expression of the *TIGR* gene in the iris, ciliary body, and trabecular meshwork of the human eye. *Ophthalmic Genet* 2000;21:155-169.
- Swiderski RE, Ross JL, Fingert JH, et al: Localization of *MYOC* transcripts in human eye and optic nerve by in situ hybridization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3420-3428.
- Noda S, Mashima Y, Obazawa M, et al: Myocilin expression in the astrocytes of the optic nerve head. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:1129-1135.
- Williams-Lyn D, Flanagan J, Buys Y, et al: The genetic aspects of adult-onset glaucoma: A perspective from the Greater Toronto area. *Can J Ophthalmol* 2000;35:12-17.
- Alward WLM, Kwon YH, Khanna CL, et al: Variations in the myocilin gene in patients with open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1189-1197.
- Yoon SJK, Kim HS, Moon JI, et al: Mutations of the *TIGR/MYOC* gene in primary open-angle glaucoma in Korea. *Am J Hum Genet* 1999;64:1775-1778.

53. 緑内障遺伝子

真島行彦
慶應義塾大学医学部眼科

緑内障において家族歴 (+) は危険因子の1つであり、常染色体優性遺伝する開放隅角緑内障の疾患遺伝子座は現在7カ所が報告され、そのうち *myocilin* と *optineurin* の2つが明らかにされた。

■緑内障は多因子疾患

最近、わが国では開放隅角緑内障の90%が正常眼圧緑内障(最高眼圧が21 mmHg以下)と報告された¹⁾。正常眼圧緑内障がこれだけ多いことは、眼圧に対して、欧米人とは異なる日本人特有な遺伝的背景の存在、たとえば視神経乳頭の脆弱性(篩状板やアストロサイトの脆弱性)に関連する遺伝的因子の存在、が疑われる。すなわち緑内障は多因子または多遺伝子疾患であり、その発症には図1に示すごとく種々の因子の関与が考えられる。発症・進行には眼圧因子が主として関与しているが、眼圧因子とともに視神経乳頭の脆弱性や血管機能障害など非眼圧因子の関与も考えられる。これら非眼圧因子は、緑内障感受性遺伝子とよばれる遺伝的因子の存在が考えられるが、現在明らかになったものはない。

■緑内障と家族歴

以前から、緑内障患者のなかには家族性のものがあることが広く知られていた。欧米では、緑内障全体のなか

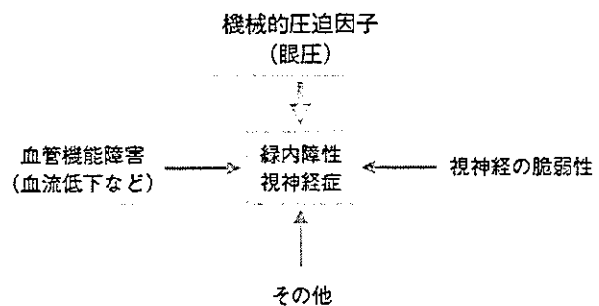


図1 緑内障の危険因子
緑内障は多因子疾患である。

で家族性緑内障が占める割合にはさまざまな報告があり、低いもので緑内障全体の十数%、高いもので約50%となっている。慶應義塾大学病院眼科では開放隅角緑内障患者の約30%に家族歴がみられた。外国では、緑内障発症の相対危険度は、家族歴があると2.85倍(1.82~4.46)であるが、特に、同胞に家族歴があると3.69倍(2.10~6.48, 95% CI)、両親では2.17倍(1.07~4.41)、子供では1.12倍(0.28~4.86)と報告されて

表1 緑内障遺伝子と染色体マッピング

遺伝子座	染色体部位	遺伝子	緑内障の型	遺伝形式	診断年齢(歳)
GLC1A	1q23-25	<i>MYOC</i>	JPOAG	常染色体優性	5~77
GLC1B	2cen-q13	不明	POAG	常染色体優性	>40
GLC1C	3q21-24	不明	POAG	常染色体優性	>40
GLC1D	8q23	不明	POAG	常染色体優性	
GLC1E	10p15-14	<i>OPTN</i>	NTG	常染色体優性	23~65
GLC1F	7q35-36	不明	POAG	常染色体優性	25~70
GLC1G	5q21-22	不明	POAG	常染色体優性	
GLC3A	2p21	<i>CYP11B1</i>	PCG	常染色体劣性	<3
GLC3B	1p36	不明	PCG	常染色体劣性	<3

GLC1: 開放隅角緑内障, GLC2: 閉塞隅角緑内障, GLC3: 先天緑内障. JPOAG: 若年発症原発開放隅角緑内障, POAG: 原発開放隅角緑内障, NTG: 正常眼圧緑内障, PCG: 先天緑内障.

現在、開放隅角緑内障の原因遺伝子の染色体座として7カ所明らかになったが、そのうち2つの遺伝子、*myocilin* (*MYOC*) と *optineurin* (*OPTN*) が同定された。

(Human Genome Organization/Genome Database Nomenclature CommitteeによるGLC分類)

いる²⁾。すなわち、家族内に緑内障の患者がいるということは、緑内障発症の危険因子の1つである。これらの事実は緑内障遺伝子の存在が考えられるが、特に、親子よりも同胞に緑内障があると発症しやすいことから、遺伝的要素以外にも環境的因子の双方が関係している多因子疾患であることも示している。

■緑内障遺伝子

表1に現在までに判明している原発緑内障遺伝子座を示す。開放隅角緑内障の疾患遺伝子座位は報告された年代順にGLC1AからGLC1Gまで7カ所が報告され、先天緑内障ではGLC3AとGLC3Bの2カ所が報告されている。そのうち遺伝子が同定されたのは、GLC1Aのmyocilin (MYOC)³⁾とGLC1Eのoptineurin (optic neuropathy inducing protein: OPTN)⁴⁾、そしてGLC3AのチトクロームP450 1B1 (CYP1B1)⁵⁾の3つである。

Myocilin 遺伝子の異常は3~4%の患者にみられ、若年発症で、眼圧がかなり高くなることが特徴である。Optineurin 遺伝子の異常をもつ患者は少なく、また、optineurin は神経保護に関連するとされている。開放隅角緑内障における7つの緑内障遺伝子は、常染色体優性

遺伝するため遺伝子に異常があれば、将来発症する確率が高いことを示す。したがって、遺伝子診断を行えば、将来発症する危険性の有無がわかる。しかしながら、現時点で同定された緑内障遺伝子は2つだけなので、遺伝子診断はコストを考えれば、臨床的にスクリーニングする意味は少ない。

文 献

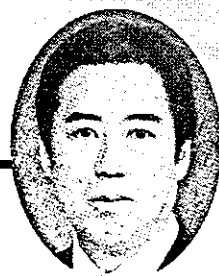
- 1) Iwase A, Suzuki Y, Araie M et al : The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese : the Tajimi Study. *Ophthalmology* 111 : 1641-1648, 2004
- 2) Tielsch JM, Katz J, Sommer A et al : Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 112 : 69-73, 1994
- 3) Stone EM, Fingert JH, Alward WLM et al : Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275 : 668-670, 1997
- 4) Rezaie T, Child A, Hitchings R et al : Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 295 : 1077-1079, 2002
- 5) Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M : Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet* 6 : 641-647, 1997

☆

☆

☆

代替医薬品による緑内障治療 アンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬



慶應義塾大学医学部眼科学 助教授 真島 行彦

レニン・アンギオテンシン系と眼圧

レニン・アンギオテンシン系は強力な血管収縮作用により血圧を上昇させるが、眼局所（網膜、毛様体）にもレニン・アンギオテンシン系が存在し、房水動態に関与する（図1）¹⁾。実際にアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬やアンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬の投与により眼圧が下降することが報告されており、これを支持している²⁾。眼圧下降の機序として、動物実験からは uveal flow の増大が考えられている³⁾。

アンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬と眼圧

われわれは、正常人38名（男性21名、女性17名）において、アンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬であるカンデサルタン（プロプレス[®]）12mgを内服させ、1時間ごとと6時間までと24時間後に、それぞれの眼圧（右眼）、血圧（拡張期および収縮期）および脈拍数を検査した。結果を図2に示す（黒丸）。One-factor ANOVA検定にて、多群間で統計学的に有意差がみられた（ $p < 0.001$ ）。Fisher's PLSD検定にて、すべての時間において内服前より有意に眼圧は低下していた（ $p < 0.01$ ）。眼圧下降は内服後3時間で最大となり、24時間下降効果は維持された。血中濃度も約4時間で最大となるので、4時間までは濃度依存性に眼圧が下降する。血圧（拡張期および収縮期）や脈拍数に有意の変化はみられなかった。これまでも正常人では血圧の有意な低下はないと報告されている。白丸は高眼圧症の2名であるが、内服後8～10mmHgの眼圧低下がみられ、眼圧が高いほど効果があり、24時間持続した。高眼圧の状態にしたモデルウサギにおいてもアン

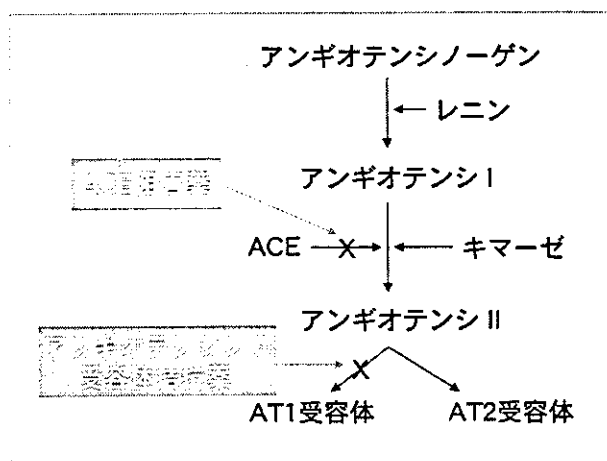


図1 レニン・アンギオテンシン系

ギオテンシンⅡ受容体拮抗薬の点眼薬は、眼圧が高いほど効果の強いことが報告されている。

アンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬の 緑内障治療として臨床応用は可能か

アンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬は高血圧でない人にはそれほど血圧下降をきたさないことが報告されている。したがって、ダイアモックス[®]が何らかの理由で内服できず、高血圧を合併していない緑内障患者では使用できる可能性がある。実際に慶應義塾大学医学部附属病院では、倫理委員会の承認を得た後に、患者の了解の元に使用している。特に、ダイアモックス[®]の内服ができない患者さんの代替医薬品として、何人かに対しては効果があり使用している（プロプレス[®] 8mgまたは12mg）。また、本薬剤は高血圧患者に使用されているが、血圧低

下作用だけでなく、臓器保護作用（リモデリング抑制、循環改善、AT2受容体刺激など）のあることが報告されており、緑内障患者においても、何らかの神経保護作用が期待できると思われる。

一方、緑内障患者は高血圧の合併率が30～40%と高く、われわれ眼科医は日常の診察において緑内障患者で高血圧治療薬を内服している場合、問診にて薬剤を把握することが重要である。すなわち、アンギオテンシンII受容体拮抗薬やACE阻害薬を内服している患者の眼圧は、実際の眼圧よりも数mmHg程度低いことを念頭に入れておく必要があることを示唆している。カルシウムチャンネル阻害薬では眼圧が上がるとも報告されている（Nifedipine）。アンギオテンシンII受容体拮抗薬として、ニューロタン[®]、プロプレス[®]、ディオバン[®]、ミカルデイス[®]、オルメテック[®]が現在販売されている。

点眼薬が開発されている

現在、アンギオテンシンII受容体拮抗薬の点眼薬（オルメサルタン）の開発も行われている（フェーズI）³⁾。眼圧下降と臓器保護作用が期待される薬剤かもしれない。

文 献

- 1) Cullinane AB, Leung PS, Ortego J, et al : Renin-angiotensin system expression and secretory function in cultured human ciliary body non-pigmented epithelium. Br J Ophthalmol 86 : 676-683, 2002
- 2) Costagliola C, Verolino M, De Rosa ML, et al : Effect of oral losartan potassium administration on intraocular pressure in normotensive and glaucomatous human subjects. Exp Eye Res 71 : 167-171, 2000
- 3) Inoue T, Yokoyama T, Mori Y, et al : The effect of topical CS-088, an angiotensin AT1 receptor antagonist, on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in rabbits. Curr Eye Res 23 : 133-138, 2001

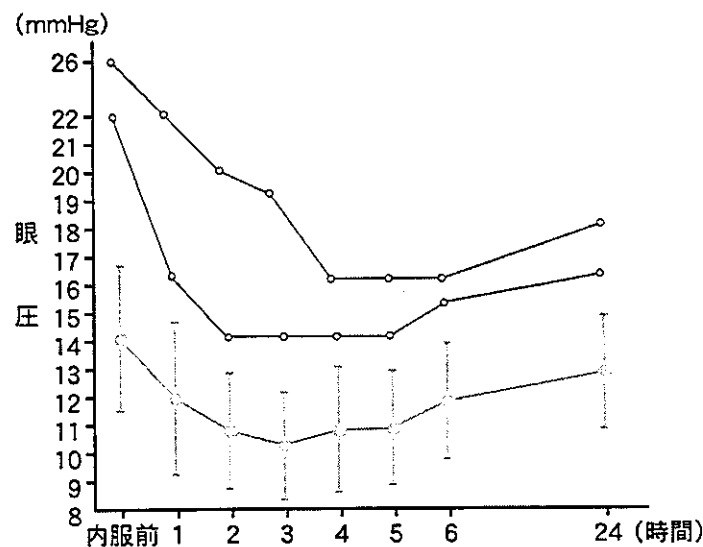


図2 アンギオテンシンII受容体拮抗薬による眼圧下降作用
高眼圧症2名(○)および正常人38名(●)の平均±標準偏差

第 108 回 日本眼科学会総会 宿題報告IV

眼科検査診断法

個別化医療の時代にむけての遺伝子診断

真島 行彦

慶應義塾大学医学部眼科学教室

共同研究者

大竹雄一郎, 谷野 富彦, 船山 智代, 石川 果林, 橋爪 公平, 木村 至, 鈴木浩太郎, 川村 亮介
 泉 香奈子, 稲垣 陽子, 吉田 和秀, 張 強, 相馬久美子, 大出 尚郎, 小口 芳久(慶應義塾大学医学部眼科学教室)
 工藤 純, 清水 信義(慶應義塾大学医学部分子生物学教室)
 島田 直樹, 宮木 幸一(慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室)
 岩田 岳, 田中 靖彦(国立東京医療センター内感覚器センター)

緑内障遺伝子解析研究会

中元 兼二, 安田 典子(東京警察病院), 出田 秀尚(出田眼科病院), 福地 健郎, 阿部 春樹(新潟大学)
 藤巻 拓郎, 村上 晶(順天堂大学), 朝岡 亮, 堀田 喜裕(浜松医科大学)
 木村 章, 谷原 秀信(熊本大学), 金本 尚志, 三嶋 弘(広島大学)

要 約

多くの疾患は遺伝的因子と環境因子の複雑な相互関係により発症すると考えられている。遺伝的要因の強い遺伝性疾患における遺伝子診断は確定診断である。一方、生活習慣病に代表される多因子(多遺伝子)疾患における遺伝子診断はリスク診断である。

遺伝子診断を行う上で、新たな2つの診断技術を臨床応用した。1) Invader 法は核酸増幅を必要としない脱 polymerase chain reaction (PCR) 法である。大量検体における既知の遺伝子変異を効率良く検出するために構築した。さらに Invader 法を用いて、ミトコンドリア DNA 変異のヘテロプラスミーを定量する方法を構築した。2) Denaturing high performance liquid chromatography 法を利用した WAVE[®] 解析法は、未知の遺伝子変異をスクリーニングする方法で自動的に大量検体が処理される。

遺伝子診断の臨床的意義は、単一遺伝子疾患と多因子(多遺伝子)疾患に分けて考える必要がある。単一遺伝子疾患における遺伝子診断の臨床的意義は、以下の3つが考えられる。1) 遺伝子変異型に基づく新たな臨床分類により疾患が整理された。2) 確定診断のための遺伝子診断で、現在臨床応用された疾患はレーベル病である。3) 早期診断、早期治療のための遺伝子診断として、臨

床上有用なのは開放隅角緑内障である。家族歴は緑内障の危険因子の一つであり、現在、緑内障遺伝子は myocilin と optineurin が明らかになっている。発症前に遺伝子変異が確認されれば、早期治療が可能となる。日本人においては、myocilin 変異は3%、optineurin 変異は0.25%にみられた。

多因子疾患における遺伝子診断の臨床的意義は、主にリスク診断である。単一遺伝子疾患との違いは、対立遺伝子の浸透率の違いで、疾患の発症リスクは数倍程度にすぎない。多因子疾患における遺伝的要因の解明は疾患感受性遺伝子の同定を行う。方法は候補遺伝子多型をマーカーとして、多数症例[原発開放隅角緑内障(POAG) 201名, 正常眼圧緑内障(NTG) 234名, 正常人 236名の合計 671名]を用いて case-control 関連研究を行った。緑内障感受性遺伝子同定するに当たり、候補遺伝子法を用いて 38 遺伝子 52 多型を検討し、統計学的に有意の関連があった遺伝子は、AT 1, AT 2, PON 1, GSTT 1 NOS 3, EDN 1であった。レーベル病患者の萎縮期には緑内障様の視神経乳頭陥凹を来すが、ミトコンドリア DNA 変異が緑内障進行の危険因子であるか否かを検討した。その結果、緑内障患者 421 名中 7 名に変異がみられたが、正常人 236 名には確認されなかった。7 名の

別刷請求先：〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 真島 行彦
 (平成 16 年 8 月 18 日受付, 平成 16 年 10 月 1 日改訂受理)

Reprint requests to: Yukihiro Mashima, M.D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine,
 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received August 1, 2004 and accepted in revised form October 1, 2004)

平均診断時年齢は 64.9 ± 10.6 (平均値 \pm 標準偏差) 歳と高齢であった。緑内障は加齢とともに有病率は上昇するが、ミトコンドリア DNA 変異が特に高齢者の緑内障患者に関連する可能性が示唆された。

レーベル病はミトコンドリア DNA 変異と環境因子が関連して発症する多因子疾患であるが、視神経萎縮には酸化ストレスやアポトーシスが関与していることが報告されている。今回、11778 変異を持つレーベル病患者 87 名において、酸化ストレス (7 遺伝子) やアポトーシス (2 遺伝子) に関連する遺伝子多型と発症時年齢および最終視力との関連を検討した。その結果、発症年齢に関して、*EPHX1* 多型 (Tyr 113 His) および *TP53* 多型 (Arg 72 Pro) と統計学的に有意な相関があり、また相加作用もあった。最終視力とは関連はなかった。レーベル病の臨床所見に核 DNA の変異が関与する可能性が示唆された。

アンギオテンシン II 受容体ブロッカー内服薬が緑内障治療の代替医薬品としての応用可能か、さらに眼圧下降効果と遺伝子多型が関連するかを検討した。正常人 38 名において、カンデサルタン 12 mg を内服させ 1 時間毎に 6 時間までと 24 時間後にそれぞれ、眼圧、血圧、脈拍数を検査した。眼圧はすべての時間において内服前

より有意に低下していた。血圧や脈拍数に有意の変化はみられなかった。眼圧下降効果と 3 種類の AT1 受容体多型 (1166A>C, -521C>T, -713T>G) との関連を検討したが、関連はなかった。

21 世紀のゲノム医療の時代における遺伝子診断の意義は、多因子疾患におけるリスク診断である。遺伝子診断による確定診断やリスク診断を臨床応用するために、Invader 法を用いて遺伝子診断パネルのプロトタイプを作成した。現在は確定診断のためのレーベル病と緑内障遺伝子 *myocilin* 変異を検出するパネルである。将来は緑内障のリスク診断するための緑内障関連遺伝子診断検出パネルの作成を予定している。緑内障感受性遺伝子変異や多型の検索は、各個人のゲノムの多様性、すなわち緑内障になりやすい体質の差や進行しやすい体質の差を検出する。その情報は、各個人に応じた発症の危険性や予防、予後予測、および薬剤などの治療法の選択が行われる個別化医療への道が開ける。さらには新しい治療薬の開発につながることを期待される。(日眼会誌 108: 863-886, 2004)

キーワード：インベーター法、緑内障、レーベル病、多因子疾患、単一遺伝子疾患、遺伝子診断

A Review

DNA Diagnosis in the Age of Individual Made-to-order Medications

Yukihiko Mashima

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

Abstract

Human diseases develop by complex mutual relationships of genetic and environmental factors. In inherited diseases, DNA diagnosis of the disease-causing genes provides a confirmation of the disease. On the other hand, DNA diagnosis of the disease-sensitive genes in multifactorial diseases, such as the lifestyle-related diseases (common diseases), provides the risk of developing the disease.

Two new technologies are being used for DNA diagnosis in the clinic. The first is called Invader Technology and is a non-PCR method and is useful for detecting well-known genetic variations in large samples efficiently. We have developed a method to quantify the heteroplasmy of mitochondrial DNA mutations by this technique. The second technique, called WAVE[®], uses denaturing high-performance liquid chromatography to screen for mutations in a large number of samples automatically and efficiently.

Clinical DNA diagnoses are divided into those for

single genetic diseases and those for multifactorial diseases. The purposes for DNA diagnosis in single genetic diseases are: 1) to propose a new clinical classification of the disease, such as *TGFBI*-related corneal dystrophy or retinitis pigmentosa, based on the genotypes; 2) to confirm a clinical diagnosis, such as Leber's hereditary optic neuropathy (LHON); and 3) to provide an early diagnosis before the development of the disease and thus provide an opportunity to start early treatment. For example, a family history of glaucoma is one of the risk factors for developing glaucoma. The frequency of mutations in the glaucoma genes, *myocilin* and *optineurin*, were found to be about 3% and 0.25%, respectively, in Japanese.

The significance of DNA diagnosis in multifactorial diseases is that it provides a risk diagnosis for an individual. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of disease-sensitive genes are associated with only a 2- to 3-fold risk of developing the disease. A case-

control association study was performed using many SNP markers to identify glaucoma-sensitive genes. A total of 671 Japanese individuals, 201 POAG patients, 234 NTG patients, and 236 normal controls were examined. Fifty-two SNPs in the 38 genes were examined to identify the glaucoma-sensitive genes as candidate genes, and SNPs in *AT 1*, *AT 2*, *PON 1*, *GSTT 1*, *NOS 3*, and *EDN 1* were associated with glaucoma statistically.

Mitochondrial(mt) DNA mutations associated with LHON might be risk factors for open-angle glaucoma, because abnormal optic disc excavations are also found in LHON patients. A total of 651 blood samples were screened for 6 LHON-associated mutations with the Invader assay. Seven patients had one of the five mutations, but none had developed LHON. The 5 mutations were not identified in 236 normal controls. MtDNA mutations may make the optic disc more susceptible to damage in glaucoma patients.

The clinical variability in LHON patients suggests that the disease most likely results from multifactorial mechanisms. To determine whether genetic polymorphisms for oxidative stress and apoptosis cause clinical variability in patients with LHON, 12 polymorphisms in 10 genes were analyzed in 87 patients with the 11778 mutation in relation to the age at onset and final visual acuity. LHON patients carrying homozygous His 113 in the *EPHX1* gene or homozygous Arg 72 in the *TP53* gene developed

the disease earlier than those without this genotype. Thus, nuclear genetic polymorphisms related to oxidative stress or apoptosis may modify the age of LHON onset.

A clinical trial of 38 healthy volunteers without systemic diseases or eye diseases was performed using an angiotensin II receptor blocker (candesartan cilexetil) as an alternative drug for lowering intraocular pressure (IOP). After a single oral dose of candesartan cilexetil, the IOP fell significantly for 24 hr. There was no association between the effects of oral candesartan cilexetil and the three SNPs in the *AT 1* gene.

In the 21st century, DNA diagnosis for multifactorial diseases will be required to determine the treatment plan for individuals or to prevent diseases. We have developed a panel of tests by Invader assay for clinical use to detect mutations in the myocilin gene or in LHON. In the future, we will develop a panel to detect SNPs in the glaucoma-sensitive genes to diagnose individuals at risk for developing glaucoma. Such information is expected to help develop new medications.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 108 : 863-886, 2004)

Key words : Invader assay, Glaucoma, Leber's hereditary optic neuropathy, Multifactorial disease, Single gene disease, DNA diagnosis

I はじめに

生物はゲノムに書き込まれた情報に従い遺伝子の発現が厳密にコントロールされることにより、必要な蛋白質が作られ、健康な生活が維持されている。しかし、様々な外的要因や内的要因により、正常な生命活動の維持に必要な物質にアンバランスが生じた状態により病気は発症する(図1)。遺伝性疾患では遺伝的因子がより強く関与し、いわゆる生活習慣病といわれる common disease (ありふれた病気)は、遺伝因子と環境因子の複雑な相互関係により発症すると考えられている。また、common disease における遺伝因子である疾患感受性遺伝子の解明は、common disease の予防への道を広げる新たな武器として期待されている¹⁾。現在臨床応用されている遺伝子診断には、主にウイルス感染症の診断、癌の診断、遺伝病の診断があり、数社の臨床検査会社が検査を有料で提供している。これらの遺伝子検査は確定診断である。一方、今後は common disease の各個人での遺伝要因のリスク診断、すなわち疾患感受性遺伝子診断が可

能になり、その人に応じた予防、治療が行われる個別化医療への道が開ける。

我々は固有の遺伝情報を持っており、ゲノムの個人差の遺伝情報を調べることにより病態の解明だけでなく、発病の予知まで可能になってきた遺伝子診断であるが、一方では、その使い方を誤ると、患者への精神的苦痛や差別をもたらしかねない側面を持っていることを十分に認識する必要がある。

II 新たな遺伝子診断技術の臨床応用

遺伝子診断における新しい技術が開発されているが、多数例を短時間に解析するシステムとして以下の2つが今後の遺伝子診断を進める上で重要な技術と思われる構築した。遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。レーベル遺伝性視神経症(以下、レーベル病)患者、緑内障患者および正常人からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサイン

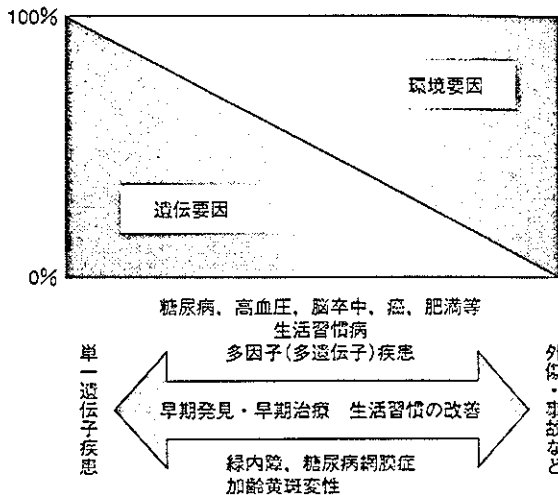


図1 疾患の発症に関連する遺伝的要因と環境的要因との関係。

生活習慣病に代表される多因子疾患では、遺伝的要因と環境的要因が複雑に関連する。遺伝的要因が強い疾患では、早期診断や疾患によっては早期治療が可能であり、環境的要因が強い疾患では、生活習慣の改善が治療となる。疾患において遺伝的要因を診断するのが遺伝子診断である。遺伝的要因は個人により異なるため、個別化医療に应用できる。眼科領域の多因子疾患には緑内障、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性がある。

した後、血液を採取し、DNA を抽出した。

1. Invader 法は核酸増幅を必要としない脱 polymerase chain reaction (PCR) 法

Invader 法は PCR 法を使用せず、1 塩基置換を検出できる方法である。2 種類のアレル特異的のシグナルプロ

ブ(wild-type probe, mutant probe)、インベダーオリゴ、fluorescence resonance energy transfer (FRET) プロブと 2 色の蛍光標識を用いて、等温かつ均一な反応系で同時に野生型と変異型の 1 塩基置換を検出する方法である²⁾。原理を図 2 に示す。Invader 法によるアッセイは、Third Wave Technologies 社から提供された 96-well プレートを用いた。各 well には Cleavase[®] enzyme XIII, FRET probe, MOPS buffer, および polyethylene glycol が乾燥された状態で予め入っている。アッセイには、96-well プレートに熱変性した DNA と wild-type probe, mutant probe およびインベダーオリゴを入れ、15 μL/well の反応系で、63°C で 1~2 時間インキュベーションした後、蛍光強度を計測し、1 塩基置換を検出する。現在、反応系を 63°C でアッセイし、同時に蛍光強度を計測する機器が開発されている(高速蛍光マイクロプレートリーダー Fluidia T 70, 大塚電子株式会社)。Invader 法は、PCR 法を用いずに一塩基変化など既知の塩基配列の変化を同定するために開発された方法であるが、現在大量検体を短時間で、遺伝子型を同定する方法として利用されている³⁾。我々は、本研究では後述する case-control 関連研究における既知の遺伝子多型解析に用いた。解析結果の 1 例を示す(図 3)。短時間に多数検体の遺伝子多型のタイピングが可能である。

我々はこの新技術に注目し、Invader 法を用いて、レーベル病の 5 つのミトコンドリア DNA 変異(G3460 A 変異, G11778A 変異, T14484C 変異, G9101A 変異, G9804A 変異)の検出およびヘテロプラスミー定量法が

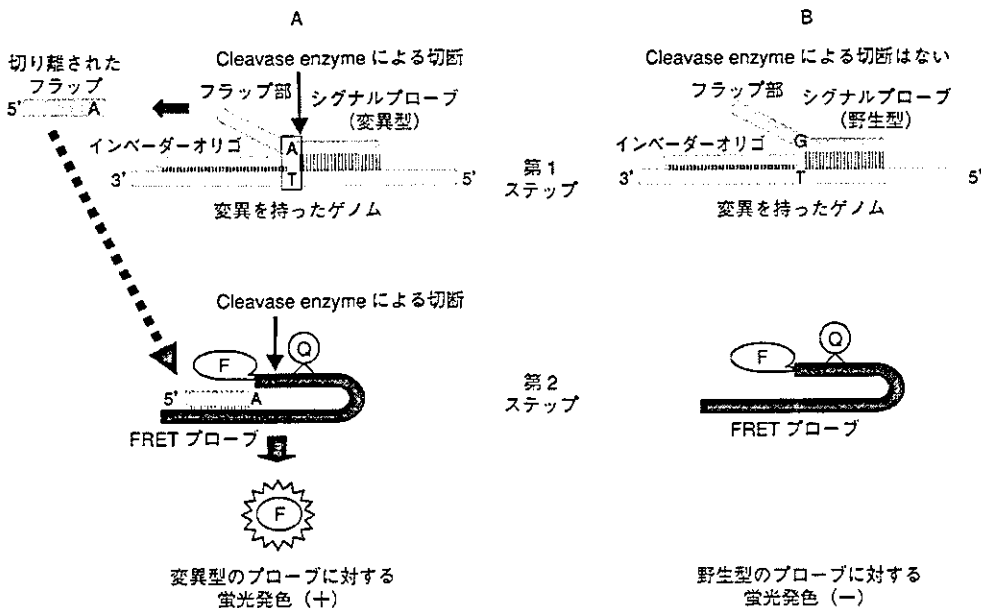


図 2 インベダー法の原理のシエーマ。

遺伝子変異を持ったゲノムに対する変異型検出プロブの反応(A)と野生型検出プロブの反応(B)。野生型検出プロブには反応しない。野生型のゲノムに対する反応は逆になり、B が反応し、A は反応しない。Cleavase は三重鎖 DNA を切断する酵素である。

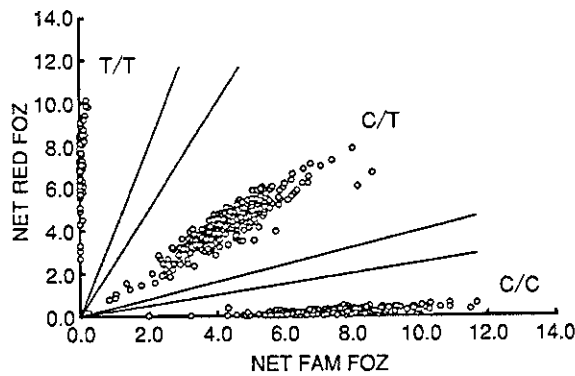


図 3 インベーター法による 300 検体の genotyping. ホモシステイン代謝酵素である MTHFR 遺伝子多型 (677 C>T) の genotyping. T/T, C/T, C/C の 3 つの型に分けられる。

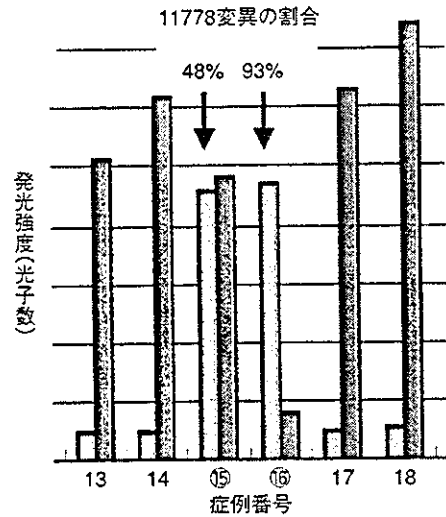


図 4 インベーター法によるミトコンドリア DNA の G11778A 変異ヘテロプラスミー定量. 症例 15, 16 は G11778A 変異をそれぞれ 48%, 93% 持つ. 他の症例は 100% 野生型 (G11778) を示す.
 ■: G11778 (野生型), ■: A11778 (変異型)

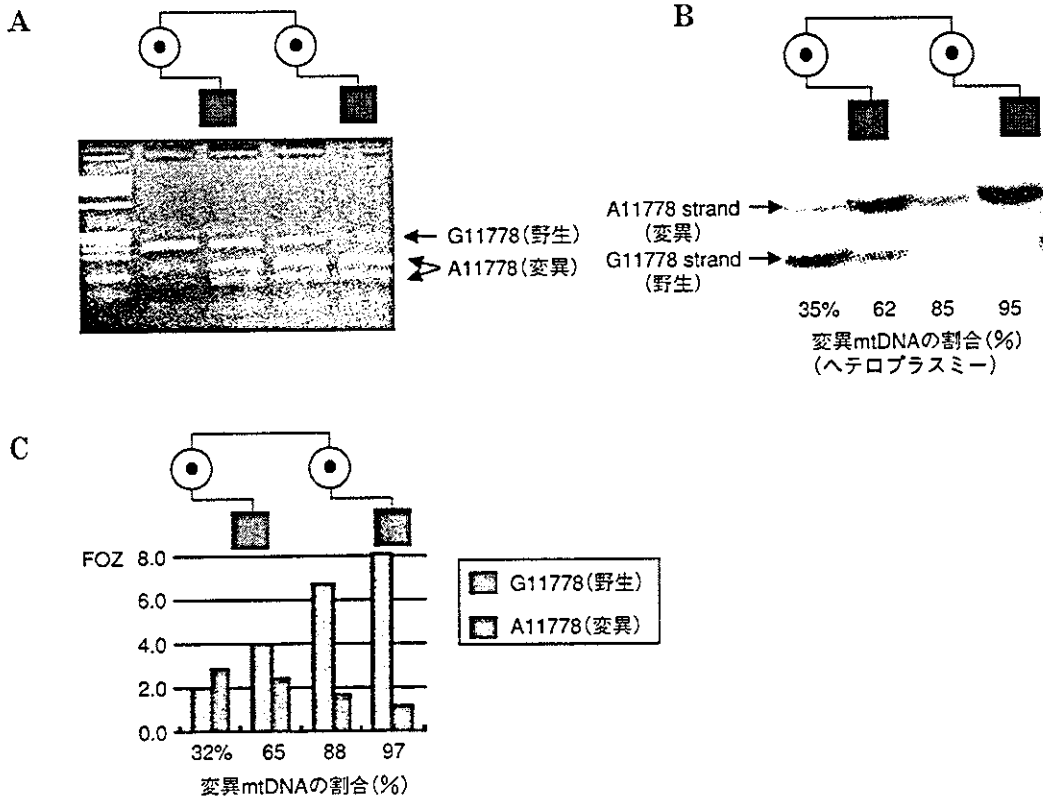


図 5 レーベル病におけるミトコンドリア DNA の G 11778 A 変異の遺伝子診断.

A: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法, B: PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法, C: インベーター法, PCR-SSCP 法とインベーター法によるヘテロプラスミー定量結果はほぼ一致している。

同時に 1 時間で行えるシステムを開発した⁴⁾. 野生型と変異型の両方のシグナルプローブを 1 つの well の中で

反応させ, それぞれの発光強度を計測することにより, 変異型のミトコンドリア DNA の割合が計測される (図

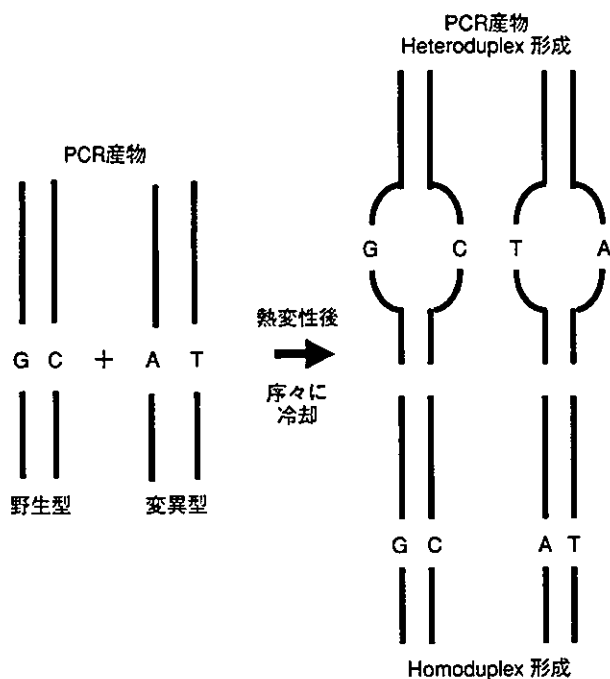


図 6 WAVE® 核酸フラグメント解析のシエマ。

PCR産物である heteroduplex は homoduplex とは熱変性パターンが異なることを利用して検出力可能である。図 7 参照。

4). ミトコンドリア DNA 変異のヘテロプラスミー定量法としてこれまで幾つかの報告があるが、一般的には PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法または PCR-制限酵素アッセイ法が用いられている⁹⁾。しかしながら、PCR 法によるヘテロ二本鎖 (heteroduplex) 形成の問題もあり、定性的である (図 5 A)。ヘテロプラスミーを正確に定量するために、我々は以前に PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) 法を開発したが⁹⁾、放射性物質を使用しており、得られた画像をデンストメトリーなどでさらに解析する必要がある (図 5 B)。従来一般的な方法である PCR-RFLP 法は、DNA 作製後結果を得るまで約 5 時間かかるのに比べ、Invader 法では 30 分程度で同時に定量まで可能であり、臨床的には簡単、正確、安価な方法である (図 5 C)。今後、レーベル病に限らず、ミトコンドリア病のヘテロプラスミーの定量には本方法が主流になると思われる。

2. 大量検体における未知の遺伝子変異をスクリーニングする WAVE® 解析法

遺伝子における塩基の変化を効率よく、かつ安価で検出する器械として、我々は denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) を利用した WAVE® 核酸フラグメント解析システム (TRANSGENOMIC 社) に注目した⁷⁾。DHPLC 法は温度調整ヘテロ二本鎖解析法で、PCR 法で増幅された DNA フラグメント内に塩基置換、欠失、挿入などがある DNA フラグメ

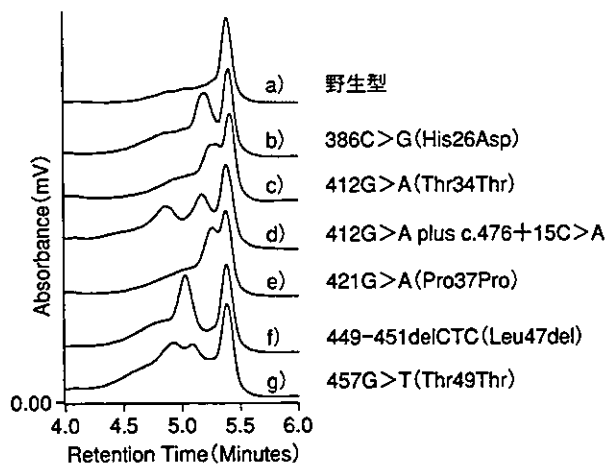


図 7 熱変性 high performance liquid chromatography (HPLC) 法による optineurin 遺伝子 Exon 4 領域の解析。

a) は野生型の homoduplex, b) ~ g) は heteroduplex.

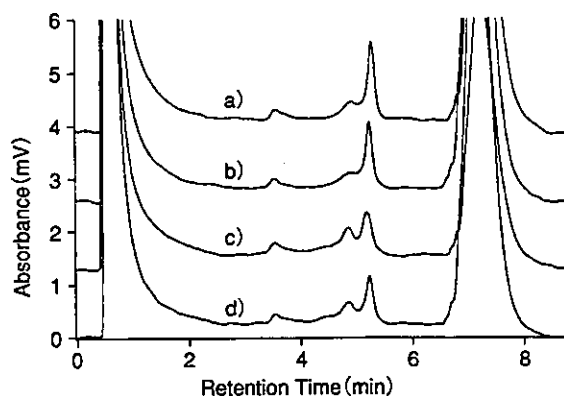


図 8 熱変性 HPLC 法による optineulin 遺伝子 Exon 16 領域の解析。

a) 野生型, b) 野生型, c) 変異型, d) 3 検体を混合 (a+b+c)。3 検体を混合しても検出感度は変わらない。大量検体のスクリーニングには 3 検体を混ぜて行うと効率が良い。

ントと野生型 DNA フラグメントとを熱変性後ゆっくりハイブリダイズすると、ヘテロ二本鎖 (heteroduplex) が形成される (図 6)。ヘテロ二本鎖はホモ二本鎖よりも低い温度で熱変性する性質があるため、WAVE® 核酸フラグメント解析システムでは両者を簡単に分離できる。解析は全自動で行われ、1 検体の解析時間は 1 つの温度で約 4 分である。検出感度は SSCP 法よりも優れており^{8,9)}、コストも他の方法に比べ安価である。

常染色体優性遺伝の開放隅角緑内障の疾患遺伝子として、現在 myocilin¹⁰⁾ と optineurin¹¹⁾ の 2 つが明らかになっているが、2 つの遺伝子変異の有無をスクリーニングするに当たり、我々はこのシステムを用いた。図 7 に optineurin 遺伝子のエキソン 4 領域における多型の波形を示す。6 種類の多型が検出されている。さらに、DHPLC 法は 3 検体を一緒に解析できる感度を有するので、

表1 Optineurin 遺伝子変異

エクソン	塩基置換	アミノ酸置換	頻度(%)		
			POAG	NTG	正常対照
Exon 4	c. 386 C>G	His26Asp	1/194(0.5)	0/217(0)	0/218(0)
Exon 4	c. 449_451delCTC	Leu47del	0/194(0)	0/217(0)	1/218(0.5)
Exon 5	c. 603 T>A	Met98Lys	33/194(17.0)	48/217(22.1)	36/218(16.5)
Exon 16	c. 1944 G>A	Arg545Gln	11/194(5.7)	15/217(6.9)	11/218(5.0)

POAG: 原発開放隅角緑内障, NTG: 正常眼圧緑内障

表2 Myocilin 遺伝子変異

エクソン	塩基置換	アミノ酸置換	頻度	
			POAG	正常対照
Exon 3	1079 T>A	Ile360Asn	1/171	0/100
Exon 3	1087 G>A	Ala363Thr	2/171	0/100
Exon 3	1105 T>C	Phe369Leu	1/171	0/100
Exon 3	1342 A>C	Thr448Pro	1/171	0/100

大量の検体を1/3の時間でスクリーニングできる(図8)¹²⁾。日本人における myocilin 遺伝子変異の頻度は3%¹²⁾、optineurin 遺伝子変異の頻度は0.25%¹³⁾と低いので、3検体を混ぜてスクリーニングした方が効率が良い。

表1に optineurin 遺伝子解析結果を示す。433家系の開放隅角緑内障患者のうち、1家系(0.25%)にのみ変異が検出され(His 26 Asp)、疾患遺伝子としては非常に稀な遺伝子である¹³⁾。一方、myocilin 遺伝子であるが、171家系の原発開放隅角緑内障(POAG)のうち、5家系(3%)に4種類の変異(Ile360Asn変異, Ala363Thr変異, Phe369Leu変異, Thr448Pro変異)が検出された(表2)¹²⁾。いずれも日本人特有の変異であったが、今回、新たな変異として、Phe369Leu変異が確認された。

大量検体の遺伝子変異をスクリーニングする方法として、1) PCR法で各エクソン領域を増幅、2) DHPLC法で変異、多型の有無を自動的にスクリーニング、そして3) 変異が疑われた領域の塩基配列を決定し、変異を確認する、というシステムが現時点では最も効率が良いシステムと考えられ、多くの施設で活用されている。

III 単一遺伝子疾患における遺伝子診断の臨床的意義

現在行われている遺伝子診断の眼科臨床における意義は、大きく単一遺伝子疾患における遺伝子診断(確定診断)と多因子(多遺伝子)疾患における遺伝子診断(リスク診断)の2つに分けられる。単一遺伝子疾患における遺伝子診断の臨床的意義は、次の3点と考えられる。

1. 遺伝子変異型に基づく新たな臨床分類による疾患の整理

常染色体優性遺伝する角膜実質ジストロフィでは、その多く(顆粒状角膜ジストロフィ, アベリノ角膜ジスト

ロフィ, ボウマン膜ジストロフィ, 格子状角膜ジストロフィ)が transforming growth factor beta induced (TGFB1) 遺伝子の変異により発症することが明らかになった¹⁴⁾。その結果、これまで混乱していた臨床分類が遺伝子変異に基づき分類することができるようになり、明瞭になった。これに関する総説は2001年の本誌に投稿した¹⁵⁾。

2. 確定診断のための遺伝子診断

臨床的に確定診断するために、遺伝子診断が広く行われている疾患はレーベル病である¹⁶⁾。ミトコンドリアDNAの3つの変異(G3460A変異, G11778A変異, T14484C変異)を検査することでレーベル病の90%が診断できるため臨床応用され、鑑別診断、治療方針の決定に参考になる¹⁷⁾。現在、数社の臨床検査会社が有料でG11778A変異検査のみを提供している。レーベル病の遺伝子診断の意義に関しては、2001年に本誌に投稿した¹⁸⁾。実際の臨床応用例を提示する。

1) レーベル病と網膜色素変性の合併家系¹⁹⁾

症例1は14歳の男児で、3歳頃視力不良のため近医を受診し、弱視が疑われた。その後、夜盲、視力低下が進行し、12歳時に近医で網膜色素変性と診断された。視力は矯正で0.1以下であった。13歳時に急速に視力低下が進行し、1人では歩けなくなった。精査を希望し当科を受診した。視力は両眼とも手動弁であった。症例2は12歳男児で、症例1の弟である。3歳頃視力不良のため近医を受診し、兄と同様に弱視が疑われた。その後、夜盲、視力低下が進行し、10歳時に兄とともに近医で網膜色素変性と診断された。兄とともに精査を希望し当科を受診した。視力は矯正で両眼とも0.1であった。Goldmann視野検査で傍中心暗点がみられた。

図9は初診時の眼底写真である。兄は視神経萎縮や網膜色素上皮の萎縮が著明であった。図10は家系図であ

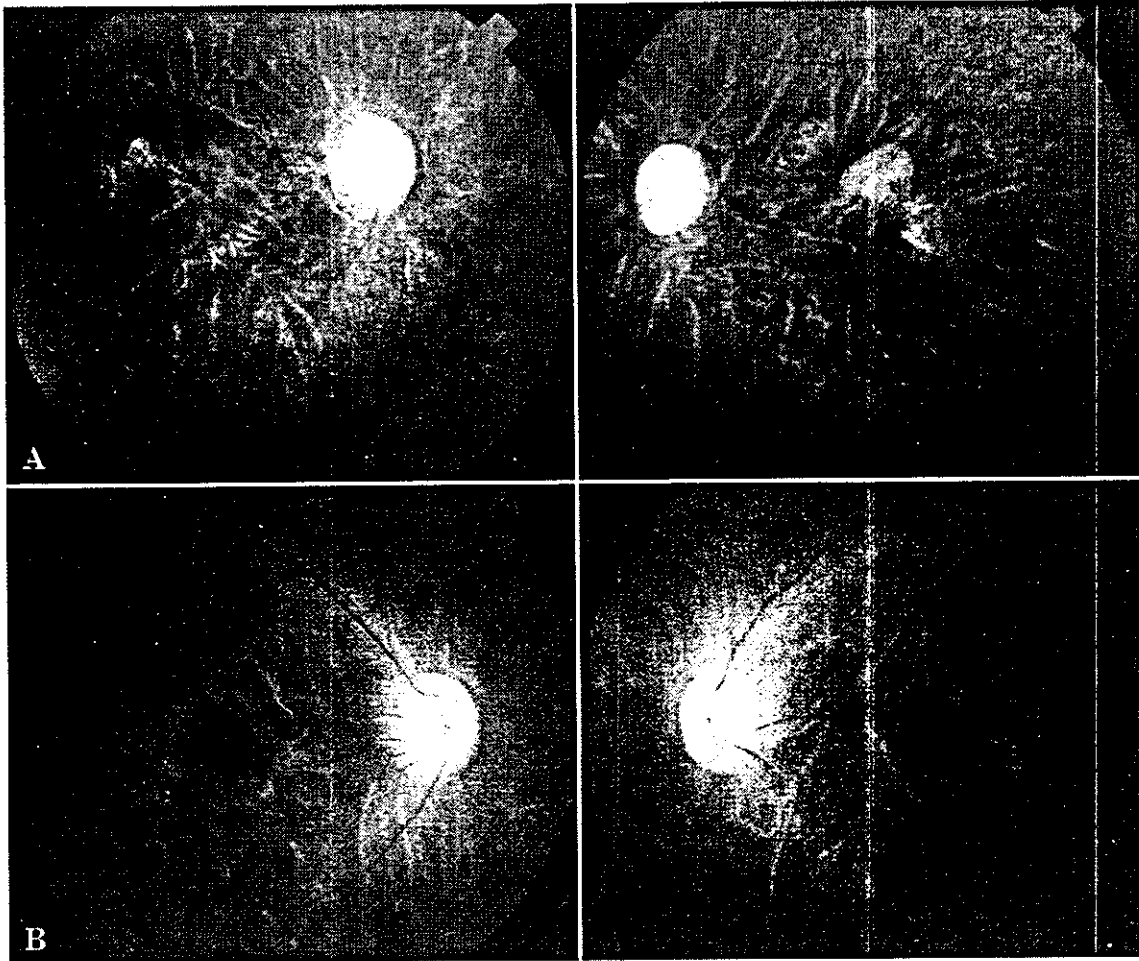


図 9 レーベル病と網膜色素変性を合併した症例の眼底写真(初診時)。
A: 発端者 14 歳男児, B: 弟 12 歳男児。兄は視神経萎縮と網膜色素上皮の萎縮が強い。

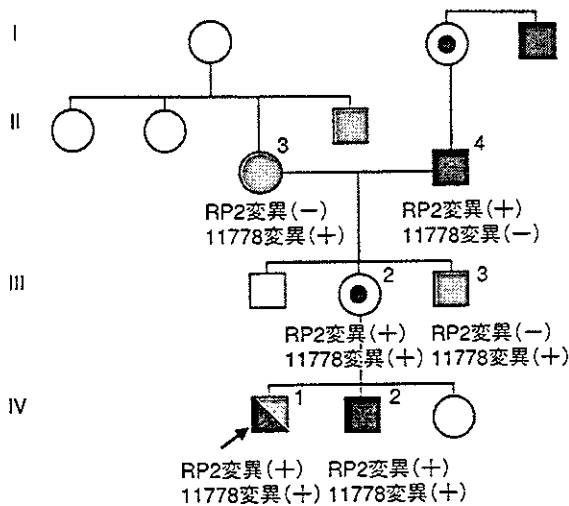


図 10 レーベル病と網膜色素変性を合併した症例の家系図。

RP2 は X 染色体伴性網膜色素変性の原因遺伝子, 11778 変異はレーベル病を生じるミトコンドリア DNA 変異。矢印が発端者を示す。発端者とその弟はともに RP2 遺伝子変異と 11778 変異を持つが、発端者のみにレーベル病を発症した。□: 男性, ○: 女性, ⊙: 保因者

■: X 染色体伴性網膜色素変性, ▣: レーベル病

る。家系図からは父方に網膜色素変性患者がいるので、X 染色体伴性網膜色素変性が考えられた。高度近視を合併していたため、RP2 遺伝子の異常を疑い遺伝子を解析した結果、コドン 278 において TC の 2 塩基挿入の変異が同定された(図 11)¹⁹⁾。これによりフレームシフトを生じ、コドン 293 で翻訳終了コドンが新たに出現する異常な蛋白質が作られる。しかしながら、RP2 遺伝子変異だけでは兄弟の臨床所見の著明な違いは説明できない。問診を進めると、母方の家族に視神経萎縮の患者がいることがわかり、レーベル病を疑いミトコンドリア DNA 検査を施行したところ、G11778A 変異が同定された。この変異は持っているも必ずしもレーベル病を発症しないことは良く知られているが、この兄弟例では兄にだけレーベル病が発症したと考えられた。同じ G11778A 変異を持ちながら発症に違いがある原因は不明であるが、兄の方がよりミトコンドリアのエネルギー代謝障害が強いことを示唆していると思われる。その結果、図 12 は初診から 4 年後の眼底写真であるが、兄はさらに網膜色素上皮の萎縮、黄斑部変性が進行したが、弟は変化が少ない。

本症例では兄弟で網膜色素変性の臨床所見にかなりの