

Fig. 5 - A proposed model for SAPK/JNK signaling pathway in hepatoblasts. The numbers in parentheses are dates of embryonic lethality reported in previous papers. TNF α elicits a wide range of biological responses, such as inflammation, tumor necrosis, differentiation, cell proliferation, and apoptosis, through the stimulation of its receptor, TNFR1. The induction of apoptosis, NF- κ B activation, and SAPK/JNK activation are simultaneously mediated through TNFR1. SAPK/JNK activation is involved in cell growth, while activation of NF- κ B protects against the apoptosis in hepatoblasts (22).

Role of SAPK/JNK in cell survival and apoptosis

In mammalian cells, apoptotic signaling cascades can be divided into two broad categories: the intrinsic (mitochondria-dependent) and the extrinsic (death receptor-mediated) pathways. The initiation of mitochondria-dependent pathway requires a change in the organelle membrane permeability that is prevented by anti-apoptotic molecules such as Bcl-2 and Bcl-X_L and promoted by pro-apoptotic molecules including Bax and Bak. The permeability change

results in the release of mitochondrial proteins. One of the released proteins, cytochrome c, associates with Apaf1 and caspase 9 to activate the effector caspase 3 (25, 26). Cellular stresses such as UV irradiation and heat shock mediate apoptosis through the mitochondria-dependent pathway (27). However, upstream signaling that regulates the pro-apoptotic molecules remains to be elucidated. Recently, the involvement of SAPK/JNK activation in pro-apoptotic function has been suggested in the study with Jnk1^{-/-} Jnk2^{-/-} and mkk4^{-/-} mkk7^{-/-} mouse

embryonic fibroblasts (MEFs). Both *Jnk1*^{-/-} *Jnk2*^{-/-} and *mkk4*^{-/-} *mkk7*^{-/-} MEFs exhibited profound defects in stress-induced apoptosis (28, 29). Furthermore, it has been reported that JNK activation causes the release of apoptogenic factors such as cytochrome c and Smac from isolated mitochondria in a cell-free system (30, 31). These results strongly suggest that the SAPK/JNK activation directly regulates mitochondria-dependent apoptosis in pro-apoptotic direction.

Recently, we generated ES cells lacking both MKK4 and MKK7 to reevaluate the role of SAPK/JNK activation in the stress-induced and mitochondria-dependent apoptosis. We utilize mouse ES cells in terms of the following advantages: 1) ES cells are a prototype of all cell lineages and can be differentiated into MEF-like cells with retinoic acid, 2) ES cells do not express death receptors including Fas and TNFR1, but have stress-induced, mitochondria-dependent apoptotic pathway, and 3) the molecular mechanism of SAPK/JNK activation is well characterized in ES cells. Interestingly, SAPK/JNK activation is not required for stress-induced and mitochondria-dependent apoptosis in ES and MEF-like cells (submitted). Thus, the physiological role of SAPK/JNK activation in cell survival and apoptosis is still controversial, suggesting an anti-apoptotic, a pro-apoptotic, or no function in these processes dependent on the types of cells and stimuli (32).

Role of SAPK/JNK in mouse immune responses

CD4⁺ and CD8⁺ T cells are two subsets of peripheral T cells that play important roles during an immune response. After antigen stimulation, CD4⁺ T cells differentiate into effector Th1 or Th2 cells that secrete cytokines to help modulate the type of immune response that is generated. Th1 cells promote cell-mediated immunity against intracellular microbial pathogens by expressing interferon- γ , interleukin (IL)-2, and lymphotoxin, whereas Th2 cells promote humoral immunity against parasites and extracellular pathogens by expressing IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13. CD8⁺ T cells differentiate into cytotoxic T cells to help defend the host during the cell-mediated immune response. Thus, defective T cell development to Th1 and Th2 cells results in impaired immune responses. Furthermore, inappropriate activation of T cells initiates and perpetuates many autoimmune diseases including rheumatoid, asthma, inflammatory bowel disease, and multiple sclerosis. It has been reported that T cells from mice deficient in the *Jnk1* or *Jnk2* gene have a defect in functional differentiation into Th1 or Th2 subsets (33, 34). Sabapathy et al have reported that JNK1 positively regulates mature T cell activation and that JNK1 and JNK2 have similar and overlapping roles in T cell function (35). Conze et al have also reported that JNK1 is required for CD8⁺ T cell activation, however, that JNK1 and JNK2 have

distinct functions in CD4⁺ T cell differentiation and CD8⁺ T cell activation (36). Furthermore, we found defective T cell activation, whereas Swat et al. found normal activation of T cells lacking SEK1 (37, 38). These results indicate that the magnitude of the stimuli, the expression of JNK isoforms, and the activation level of SAPK/JNK are important factors determining the direction and efficiency of T cell activation (35). Thus, SAPK/JNK appears to be involved in the differentiation and activation of T cells, though its precise molecular mechanisms are still controversial.

Other physiological roles and target molecules of SAPK/JNK

As described above, SAPK/JNK regulates embryonic development including cell proliferation, survival, and apoptosis, and immune responses including T cell differentiation and activation. Furthermore, it has been reported that SAPK/JNK regulates mRNA stabilization, cell migration, and cytoskeletal integrity (Fig. 1). Turnover of mRNA is an important mechanism for the regulation of gene expression in organisms from bacteria to mammals. Regulation of mRNA half-life can influence normal cell proliferation, differentiation and oncogenesis. PB-3c mast cells produce IL-3 upon stimulation with extracellular signals, and its short-lived (half-life is about 30 min) mRNA is stabilized by Ca²⁺ ionophores. Using an active MEKK1 and a dominant-negative mutant of JNK, it has been indicated that SAPK/JNK is involved in the regulation of IL-3 mRNA turnover in mast cells (39). SAPK/JNK is required for *Drosophila* dorsal closure and is also essential for cell migration in mammalian cells. Rat bladder tumor epithelial cells (NBT-II) exhibit rapid keratinocyte-like movement. Interestingly, SP600125, a specific inhibitor of JNK, suppresses the movement. Several experiments indicate that JNK1 phosphorylates serine 178 on paxillin, a focal adhesion adaptor, in NBT-II cells. Expression of a paxillin mutant (Ser178 to Ala) inhibited the migration of the cells. Thus, phosphorylation of paxillin by SAPK/JNK seems to be essential for maintaining the labile adhesions required for rapid cell migration (40). Dynamic assembly and disassembly of microtubules is essential for a variety of cellular functions, such as maintenance of cell morphology and polarity, cell division, cell locomotion, and intracellular trafficking. JNK1-deficient mice exhibit progressive degeneration of long nerve fibers and loss of microtubule integrity in dendrites. Dendritic degeneration of neuronal microtubules is associated with hypo-phosphorylation of microtubule assembly-promoting protein (MAP) 2 and its reduced ability to promote tubulin polymerization. Thus, JNK1 is required for maintaining the cytoskeletal integrity of neuronal cells and is a critical regulator of MAP activity and microtubule assembly (41).

CONCLUSIONS

Data continues to emerge implicating the SAPK/JNK-signaling pathway in a number of physiological functions that may be involved in human disease including autoimmune, anti-inflammatory, neurodegenerative diseases, and cancers. In fact, mutations in *Jnk3* gene were identified in human brain tumors (42). Similarly, mutations in *sek1* gene have been identified in human cancers of pancreas, lung, breast, colon, and prostate as tumor suppressor genes (43-45). Under these circumstances, several pharmaceutical companies have been working on the discovery of SAPK/JNK-related drugs such as an anthrapyrazolone and SP600125. Efforts by many researchers in this field may help to find effective drugs in the near future.

REFERENCES

- Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-52.
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40.
- Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Gene Dev* 2002; 12: 14-21.
- Manning AM, Davis RJ. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nature Rev Mol Drug Disc* 2003; 2: 554-65.
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, et al. JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994; 76: 1025-37.
- Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases *in vitro*. *Curr Biol* 1998; 8: 1387-90.
- Lisnock J, Griffin P, Calaycay J, et al. Activation of JNK3 α 1 requires both MKK4 and MKK7: Kinetic characterization of *in vitro* phosphorylated JNK3 α 1. *Biochemistry* 2000; 39: 3141-8.
- Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, Paterson A, Goedert M, Cohen P. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J* 2000; 352: 145-54.
- Wada T, Nagakawa K, Watanabe T, et al. Impaired synergistic activation of stress activated protein kinase SAPK/JNK in mouse embryonic stem cells lacking SEK1/MKK4. *J Biol Chem* 2001; 276: 30892-7.
- Kishimoto H, Nagakawa K, Watanabe T, et al. Different properties of SEK1 and MKK7 in dual phosphorylation of stress-induced activated protein kinase SAPK/JNK in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 16595-601.
- Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, Davis RJ. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 1998; 281: 1671-4.
- Whitmarsh AJ, Davis RJ. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 481-5.
- Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7245-54.
- Ito M, Yoshioka K, Akechi M, et al. JSAP1, a novel Jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7539-48.
- Lee CM, Onesime D, Reddy CD, Dhanasekaran N, Reddy EP. JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14189-94.
- Xia Y, Wu Z, Su B, Murray B, Karin M. JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev* 1998; 12: 3369-81.
- Bagowski CP, Ferrell JE. Bistability in the JNK cascade. *Curr Biol* 2001; 11: 1176-82.
- Bagowski CP, Besser J, Frey CR, Ferrell JE. The JNK cascade as a biochemical switch in mammalian cells: Ultrasensitive and all-or-none responses. *Curr Biol* 2003; 13: 315-20.
- Yang D, Tournier C, Wysk M, et al. Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH₂-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3004-9.
- Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, et al. SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6881-6.
- Nishina H, Vaz C, Billia P, et al. Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4. *Development* 1999; 126: 505-16.
- Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, et al. SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis. *Dev Biol* 2002; 250: 332-47.

Reprint requests to:
 Hiroshi Nishina, PhD
 Department of Physiological Chemistry
 Graduate School of Pharmaceutical Sciences
 University of Tokyo
 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku
 Tokyo 113-0033, Japan
 nishina@mol.f.u-tokyo.ac.jp

23. Kuan CY, Yang DD, Roy DRS, et al. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 1999; 22: 667-76.
24. Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* 1999; 89: 115-24.
25. Peng L, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-89.
26. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Rev Mol Cell Bio* 2003; 4: 552-65.
27. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998; 94: 739-50.
28. Tournier C, Hess P, Yang DD, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; 288: 870-4.
29. Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 2001; 15: 1419-26.
30. Aoki H, Kang PM, Hampe J, et al. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 10244-50.
31. Chauhan D, Li G, Hideshima T, et al. JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 17593-6.
32. Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *BioEssays* 2002; 25: 17-24.
33. Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 1998; 282: 2092-5.
34. Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, et al. Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 1998; 9: 575-85.
35. Sabapathy K, Kallunki T, David JP, Graef I, Karin M, Wagner EF. c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. *J Exp Med* 2001; 193: 317-28.
36. Conze D, Krahl T, Kennedy N, et al. c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8+ T cell activation. *J Exp Med* 2002; 195: 811-23.
37. Nishina H, Bachmann M, Oliveira AJ, et al. Impaired CD28-mediated interleukin 2 production and proliferation in stress kinase SAPK/ERK1 kinase (SEK1)/mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)-deficient T lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 186: 941-53.
38. Swat W, Fujikawa K, Ganiatsas S, et al. SEK1/MKK4 is required for maintenance of a normal peripheral lymphoid compartment but not for lymphocyte development. *Immunity* 1998; 8: 625-34.
39. Ming XF, Kaiser M, Moroni C. c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. *EMBO J* 1998; 17: 6039-48.
40. Huang C, Rjfur Z, Borchers C, Schaller MD, Jacobson K. JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* 2003; 424: 219-23.
41. Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LSB, Karin M. JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* 2003; 4: 521-33.
42. Yoshida S, Fukino K, Harada H, et al. The c-Jun NH₂-terminal kinase 3 (JNK3) gene: Genomic structure, chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors. *J Hum Genet* 2001; 46: 182-7.
43. Teng DH, Perry WL, Hogan JK, et al. Human mitogen-activated protein kinase kinase 4 as a candidate tumor suppressor. *Cancer Res* 1997; 57: 4177-82.
44. Su GH, Hilgers W, Shekher MC, et al. Alterations in pancreatic, biliary, and breast carcinomas support MKK4 as a genetically targeted tumor suppressor gene. *Cancer Res* 1998; 58: 2339-42.
45. Yoshida BA, Dubauskas Z, Chekmareva MA, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase 4/stress-activated protein/Erk kinase 1 (MKK4/SEK1), a prostate cancer metastasis suppressor gene encoded by human chromosome 17. *Cancer Res* 1999; 59: 5483-7.

水晶体の形成遺伝子とその変異

Genetics on the Lens Morphogenesis and Its Malformation

東 範 行*

要 約

発生は転写因子遺伝子群がカスケードをなして働く一連のシステムである。眼においては *Pax6* を頂点とする遺伝子カスケードが存在する。*Pax6* はまずヒトの先天無虹彩の原因遺伝子として見つかり、下等動物の初期胚に導入すると眼が異所性にできることから、眼形成の master control 遺伝子であると考えられるようになった。ヒト発生眼でも広範に発現し、無虹彩のほか、前眼部形成不全、先天白内障、黄斑低形成、視神経形成異常で変異が見つかったことから、発生における働きはヒトでも眼のほぼ全体を網羅していることが判明した。さらに *Pax6* の下流にあって、前眼部を形成する遺伝子 *Pitx*, *Eya1* が見つかり、先天白内障と前眼部形成異常でその変異が見出された。また、鶏やアフリカツメガエルでは *Pax6* の下流で水晶体を形成する master control 遺伝子 *L-Maf* が発見された。水晶体の発生において、これらの形態形成遺伝子はクリスタリンをはじめとする水晶体特異蛋白の発現を制御していることも明らかになった。そして、これらの構造蛋白の変異も先天白内障で次々と見つかった。これら水晶体形成遺伝子に変異が起これば同様な表現型が生ずるので、疾患概念も変化しつつある。これら発生に関する遺伝子システムの解明は、疾患の成因への理解や、遺伝相談に有用であるが、さらには将来の遺伝子治療や再生医学に結びつくことが期待される。

はじめに

眼は複雑な構造をもつ器官であり、遺伝性疾患も多いことから、これまで眼科領域では多くの疾患で原因遺伝

子が発見されてきた。代表的なものとしては、Leber 視神経症（ミトコンドリア遺伝子の変異による）、網膜色素変性症（rhodopsin, peripherin, cGMP など）、小口病（arreston, rhodopsin kinase）、色覚異常（red-green opsin）、角膜ジストロフィ（kerato-epithelin）などがある。Leber 視神経症におけるミトコンドリア遺伝子は特殊であるが、その他多くの遺伝性眼疾患は各組織に特異的に発現する構造遺伝子や酵素をコードする遺伝子の変異が原因である。一方、形態形成（発生）においては組織構築に関わる蛋白をコードする遺伝子も重要であるが、転写因子やシグナル伝達物質がきわめて重要な役割を果たしている。Leber 黒内障（guanylate cyclase の変異による）や Norrie 病（Norrie disease, *ND* 遺伝子、ムチンや成長因子と類似）、網膜分離症（*XLRS1* 遺伝子、網膜間の接着に関与）などは前者であり、先天無虹彩（*PAX6* 遺伝子）などは後者である。

水晶体は表面外胚葉から形成される特異な組織であり、最近、その発生に関わる多くの遺伝子が発見された。一方、先天白内障は発生期に起こる水晶体の形成異常であるが、これらの発生遺伝子や水晶体に特異的に発現する蛋白の変異によって起こることが明らかになってきた。これら基礎研究と遺伝学研究から、水晶体の発生や疾患に関する概念は大きく変化してきている。ここでは、眼球およびその中の水晶体の形成に関わる遺伝子と、先天白内障の遺伝子変異について最近の知見を述べる。

* Noriyuki Azuma: 国立成育医療センター眼科
 [別刷請求先] 東 範行: 〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1 国立成育医療センター眼科

I 器官・組織の発生に関わる遺伝子

細胞の核の中に存在する遺伝子は、その翻訳する蛋白の性格によって、構造蛋白、酵素、シグナル伝達物質、転写因子などに大別されるが、発生においては転写因子が重要な役割を果たしている。転写因子は遺伝子調節蛋白ともよばれ、他のDNAのおもに promoter 領域に結合して、その遺伝子の発現スイッチを on off する司令塔の役割をする蛋白である。働きの際は細胞核内で、微量にしか存在しないが、細胞が特異的機能を果たすために適切な遺伝子を適切量発現させるための司令塔の役割をもち、構造蛋白、酵素、シグナル伝達物質などはいずれもその支配下にある。ことに発生においては、複雑な組織・器官が分化するために各時期に適切な遺伝子が発現するネットワークが必要であり、そのプログラムに従って整然と形成過程は進まなければならない。たとえば、手が形成される場合には、ある時期に中胚葉細胞が増殖して手根骨、指骨、筋肉になり、外胚葉細胞から皮膚ができ、さらにある時期に指間の細胞が一斉にアポトーシスを起こすことによって各指が離れる。動物によっては、アポトーシスが完全に起こらなければ指間にヒレが残るわけである。したがって、発生（形態形成）においては転写因子遺伝子ネットワークを解明することは、一連の工程の設計図を明らかにすることを意味する。

発生に関わる遺伝子は、その中に homeobox という構造をもつことが特徴である。Homeobox は生物種を越えて発生に関与する遺伝子のきわめて多くに共通して含まれる 180 の塩基対であり、これは翻訳されて 60 アミノ酸 homeodomain となる。Homeodomain は転写因子における標的 DNA 結合部位として働くが、その普遍性から、homeobox をもつ遺伝子は発生における転写因子遺伝子、位置や空間を決定する遺伝子の指標であると考えられるようになった。

さらに、遺伝子が意外な場所に転用されるのも特徴である。眼を作る遺伝子は、同時に中枢の発生にも関与していることが多い。眼と中枢は神経系として共通点も多いが、まったく関係のない腎臓や膀胱などと同じ遺伝子が働いていることがある。これは、眼と腎臓が同起源ということではなく、遺伝子（あるいは翻訳される蛋白）

が1つの固定した機能に縛られず、融通性に富んでいて、少し条件を換えれば他の働きもできることを意味している。そして、生物は進化して複雑化する際に、しばしばこの転用を利用してきた。新しい遺伝子を作ることもあったが、これは大変なことであり、使えるものはそのままあるいは少し違えて使うほうが、はるかに効率的である。激しい進化の競争のなかで、生物はゆっくり新しい遺伝子を創作している余裕はなかったのである。そして、遺伝子がこのように多用されているため、同じ遺伝子障害によって多彩な複数臓器障害の症候群が起こることになる。

眼は最も複雑な構造をした器官であり、角膜、水晶体、網膜などその一部の組織をとっても、発生には膨大な転写因子ネットワークがあるはずである。そして、現在までにさまざまな転写因子遺伝子が見つかり、複数臓器に発現しているものも多かった。そして、これらに変異が起こればヒト疾患の原因となることも明らかになってきた。このなかで、後に述べる PAX6 遺伝子の発見が最も重要である。これが眼全体を作る遺伝子ネットワークの頂点に存在する master control 遺伝子であるからである。

II 眼形成の master control 遺伝子 PAX6 の発見と動物間の共通性

PAX 遺伝子群は paired box と homeobox を共通モチーフとしてもつ遺伝子 family で、PAX 蛋白では paired box と homeobox から翻訳される部位 paired domain と homeodomain の2つが標的遺伝子への結合部位となる（図1）。この遺伝子群は最初にショウジョウバエで発見されたが、脊椎動物では9種見つかっており、PAX6 は6番目に発見された。ヒトでは最初に先天無虹彩の候補遺伝子として染色体 11p13 領域の欠失部位から positional cloning によって発見され¹⁾、多くの変異が発見されて無虹彩の原因遺伝子であることが確定した（図2, 3）。その後、マウスやラットで変異があると小眼球になる *small eye (Sey)* 遺伝子や、ショウジョウバエで複眼が形成されない *eyeless* 遺伝子と同じものであることが判明し、Pax6 に統一された（遺伝子の表記はすべてが大文字ならヒト、頭だけが小文字ならばマウスなど他のほ乳類、全部小文字ならばショウジョウバエなどの下等動物

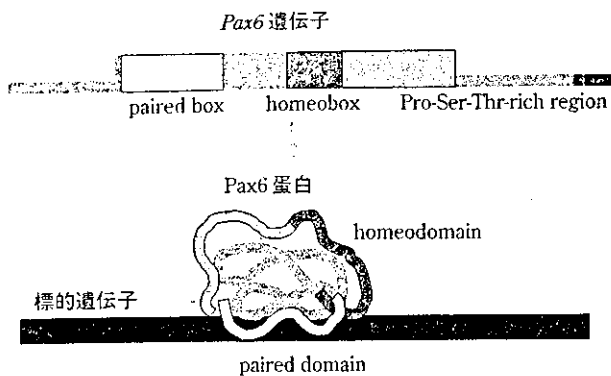


図1 PAX6 遺伝子と、これから翻訳される PAX6 蛋白
PAX6 蛋白はおもに paired domain が標的 DNA に接着して、これを制御する。

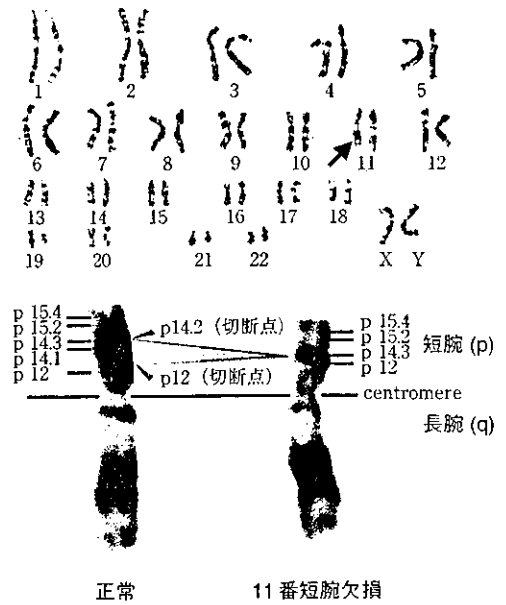


図2 先天無虹彩の染色体異常 (11番短腕欠損)

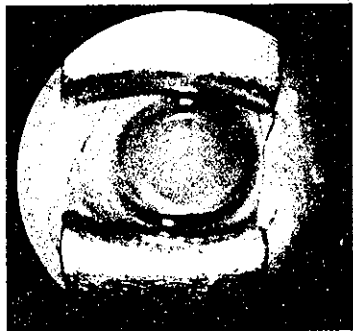
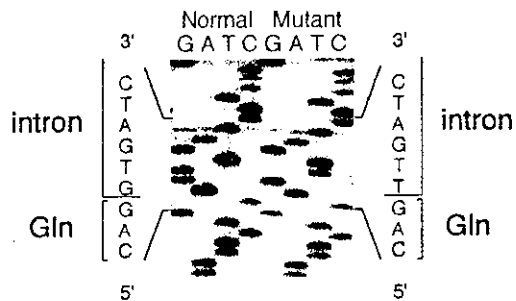


図3 黄斑と視神経の低形成を伴う先天無虹彩の PAX6 遺伝子変異 (スプライシング変異)



のものを表す。また遺伝子は斜体文字、翻訳された蛋白は標準体文字で書かれる。

さらに、ショウジョウバエで初期胚のさまざまな部位にこの遺伝子を発現させたところ (target expression)、触覚や翅、肢などで異所性に複眼が発生し、しかもこれらが光を感じたため、眼という器官全体を1つ作ってしまうような強力な遺伝子であることが明らかになった²⁾。器官が形成される場合、その過程が整然と行われるためには、全体を支配する遺伝子 (master control 遺伝子) があるだろうと予測されていたが、昆虫のような下等動物とはいえ、眼という最も複雑な器官でその遺伝子が見つかったのである (図4)。

その後、さまざまな動物で Pax6 遺伝子が見つかり、

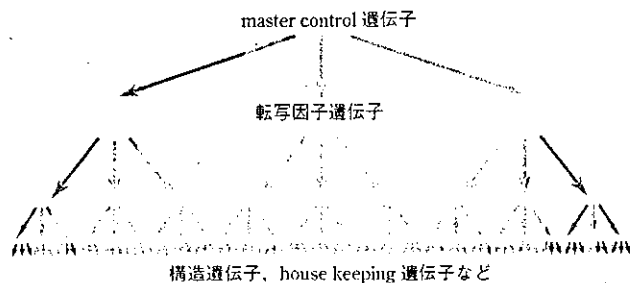


図4 形態形成遺伝子カスケード

脊椎動物、軟体動物の眼や昆虫の複眼だけではなく、プラナリアの原始的な眼や線虫の光感受性細胞にも存在していることが明らかになった。ほとんどすべての動物の

眼発生に *Pax6* が存在し、しかもその塩基配列が高度に保存されていたことは、眼の起源に関する考えに大きな転換をもたらした。動物には種によって複眼、鏡眼、カメラ眼などさまざまな構造の眼があり、かつては40～60系統の眼が別個に発生したものと考えられていた。しかし、master control 遺伝子 *Pax6* が共通に存在することは、眼が原始の動物で光を感じる細胞としてただ1度だけ発生し、進化とともに多彩な眼を作るようになったことを意味している³⁾。

III 高等動物における *Pax6* の発現とヒト疾患における変異

マウスやヒトにおける *in situ* ハイブリダイゼーションや免疫染色で示された *Pax6* の発現様式は、発生初期にまず中枢神経や眼原基に現れ、中枢神経では前脳、後脳、神経管脳室腹側、下垂体、嗅脳に発現し、眼ではまず視溝、ついで眼胞、表面外胚葉と水晶体板、網膜、角膜の順に眼球ほぼ全体を網羅している(図5)⁴⁾。以上から、*Pax6* は高等生物においても眼発生のさまざまな場面に関わっていることが判明した。言い換えれば、太古に光を感じる細胞から出発した遺伝子が、眼形態形成の中心に居続けて角膜、虹彩、水晶体、網膜など複雑な眼の形成に関わるようになったと考えられる。また、この遺伝子に変異が起こればきわめて多くの先天形成異常を起こすことが推察された。

事実、先に述べたように、先天無虹彩では多くの変異が見出された。さらに Peters 奇形のような前眼部形成不全⁵⁾、瞳孔形成異常⁶⁾、家族性角膜ジストロフィ⁷⁾、先天白内障⁸⁾、黄斑低形成⁹⁾、視神経形成異常¹⁰⁾ で変異が見つかっている(図6)。したがって、*PAX6* はヒトでも前眼部から眼底における広い範囲の形成を行っていることが、分子遺伝学からも証明された。

これまでに見つかった *PAX6* の変異型と表現型の間には遺伝子の変異が重篤なほど表現型も重症であるという法則がある。これは *PAX6* に、(1) 一對の対立遺伝子の両方とも揃っていないと正常に機能しない (haploinsufficiency)、(2) 遺伝子障害の程度と表現型が相関する (dose dependent)、という特徴があるためである。両側の対立遺伝子に変異 (homozygous) があれば眼球が

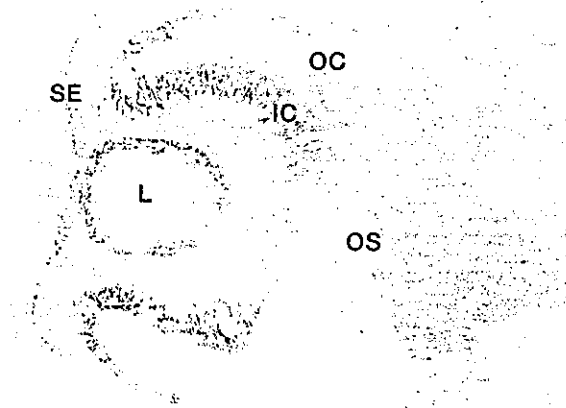


図5 *Pax6* のモノクローナル抗体による発生ヒト眼(胎齢5週)の免疫染色
表層外胚葉(SE)、水晶体胞(L)、眼杯(内板IC、外板OC)、視莖(OS)と、外胚葉を主体に眼球全体が染まる。

形成されず、重篤な中枢形成異常がある。片側の対立遺伝子の変異 (heterozygous) でも stop codon を起こす nonsense 変異であれば、その蛋白は機能しない。先天無虹彩で見つかる変異の大部分は nonsense 変異であり、その表現型は無虹彩のみならず角膜混濁、白内障、黄斑・視神経低形成など全眼球に及ぶ。一方、1つのアミノ酸だけが置換される missense 変異では、前眼部形成不全、白内障、黄斑低形成などが、眼球の一部で単独に起こることが多い。

しかし、遺伝子型と表現型の間には相関は一般にみられない。しかも、家族例あるいは孤発例同士で同一の変異をもっていても、臨床像は多彩であった。染色体異常があり、片側 allele がすべて欠損していても、軽度の missense 変異であっても同様に無虹彩症を起こしていた。これは、*PAX6* が角膜、虹彩、水晶体、網膜の発生において運命づけには重要であっても、個々の組織の細かい形成過程は下流の遺伝子が担っているからである。*Pax6/PAX6* が下流に従える遺伝子は、後に述べるいくつかの転写因子、クリスタリン (CRYAA, CRYAB, CRYD, CRYZ) の発現を亢進、CRYBB1 を抑制¹¹⁻¹⁶⁾、ロドプシン¹⁷⁾ くらいしかまだ知られていないが、その数は膨大と推測される(図4)。しかも時間や場所を違えても、発生期を通じ多くの組織で発現するので、これら下流遺伝子のわずかな発現様式の差や、細胞内環境や

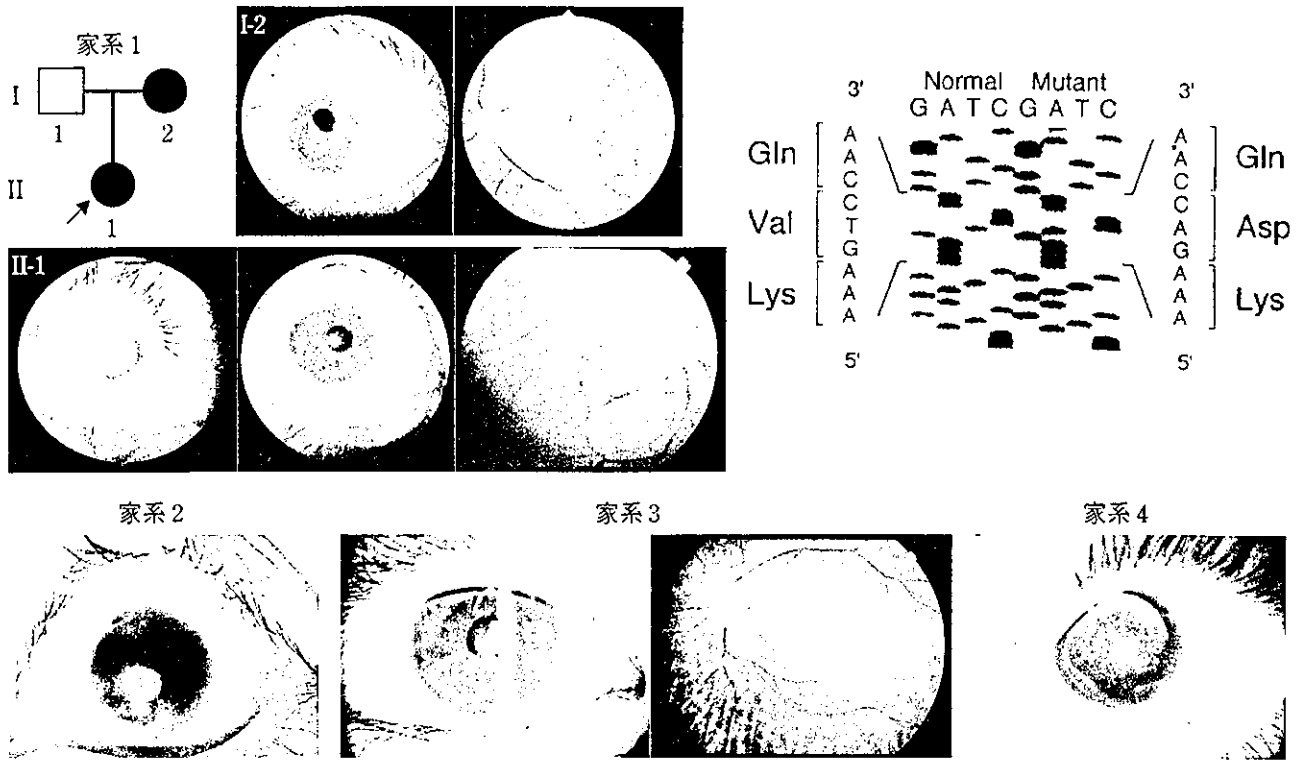


図6 PAX6遺伝子の同一変異 (exon 5a内) による多彩な表現型

家系1の発端者は右眼前眼部形成不全, 左眼角膜輪部形成不全と黄斑低形成, その母親は先天白内障術後の無水晶体と黄斑低形成, 家系2は前眼部形成不全と白内障, 家系3はAxenfeld異常と黄斑低形成, 家系4は先天白内障が両眼にみられた。

co-factorの影響によって表現型に違いが起こると考えられる。同一変異をもつ家族間で表現型が異なる一方で、一個人では左右眼の所見に差が少ないこともこれで説明できる。

IV 前眼部を形成するEYA1遺伝子

最近、ショウジョウバエにおいて *eya* (*eyes absent*) に、*so* (*sine oculis*), *dac* (*dachshund*) などの眼形成遺伝子が見つかった。これらは *eyeless* (*Pax6*) の支配下 (下流) にあり、いずれも target expression すると *Pax6* ほどではないが小さい異所性の複眼ができる。眼形成の準マスターコントロール遺伝子と言えるものである。このうち、*eya* 蛋白の機能はほとんどわかっていないが、apoptosisに関わると考えられている。その後、*eya* の相同遺伝子が哺乳類で見つかり、*Eya1*, *Eya2*, *Eya3* の3種に分かれて family を形成し、*Eya3* はごく早期の眼に、

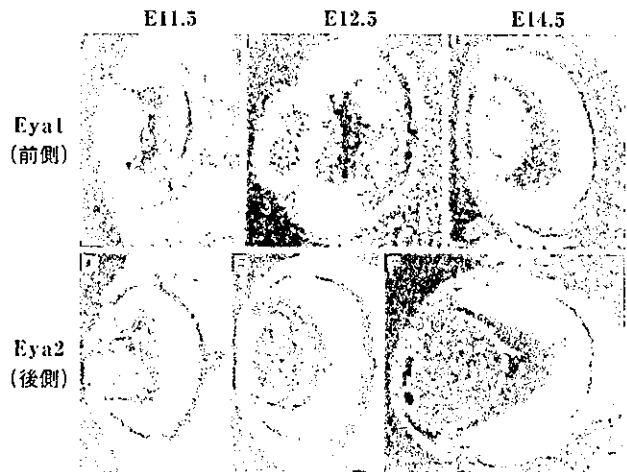


図7 マウス胚におけるEya1, Eya2の発現 (in situ hybridization)

眼球前方ではEya1が、後方ではEya2が発現し、眼球の前後軸を決定すると考えられる。(文献18より許可を得て転載)

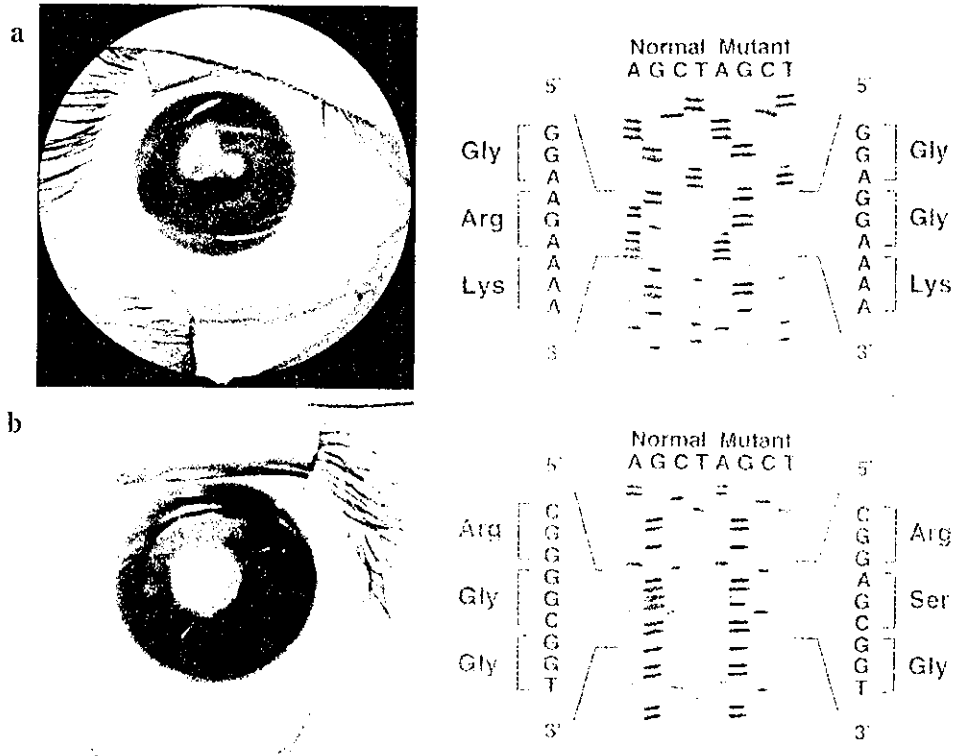


図8 Peters奇形(a)と先天白内障(b)にみられたEYA1遺伝子変異(missense)
bの症例はBranchio-oto-renal症候群であり、先天白内障とともに左の先天表胞性腎形成不全、伝音性難聴、頸部瘻管を伴っていた。

Eya1は眼球の前半に、Eya2は眼球の後半に発現することが判明した(図7)¹⁸⁾。Eya1は眼だけでなく腎や鰓弓の形成でも発現している。EYA1は、ヒトでまずBranchio-oto-renal症候群(第一鰓弓由来の頸部瘻孔と耳小骨形成不全による伝音性難聴、腎形成不全)の原因遺伝子として発見された。その後筆者らは、EYA1の変異によって先天白内障や前眼部形成異常でEYA1の変異を発見し、ヒトでも前眼部形成に関与していることを明らかにした(図8)¹⁹⁾。

V PITX/RIEG 遺伝子

ショウジョウバエの卵の最も初期に体軸の前後を決めるために極性決定遺伝子が発現するが、その前部を決定する遺伝子にbicoidがある。マウスではこれと類似する遺伝子としてPitxが見出され、3つのfamily(Pitx1, Pitx2, Pitx3)に分かれていることが判明し、ヒトでも

同様PITX1, PITX2, PITX3が見つかった。そして、Rieger症候群の遺伝子が4番染色体長腕からpositional cloningされたが²⁰⁾、これはPITX2であり、PITX2/RIEGと記載されるようになった。ついで虹彩低形成でもPITX2/RIEGの変異が発見され、さらにPITX3の変異によって先天白内障と前眼部異形成が起こることが報告された²¹⁾。この遺伝子群は前眼部形成を行っているらしい。

VI 水晶体の形成遺伝子L-Maf

Maf familyはレンズ細胞特異的転写因子であり、水晶体の形成において重要な役割を果たしている。近年、ニワトリおよびアフリカツメガエルにおいてLarge Maf(L-Maf)が水晶体形成のmaster control遺伝子であることが判明した²²⁾。L-MafはPax6の下流に存在しており、これを培養細胞(in vitro)や鶏初期胚の表層外胚葉(in vivo)に導入すると、クリスタリンなどの水晶体特

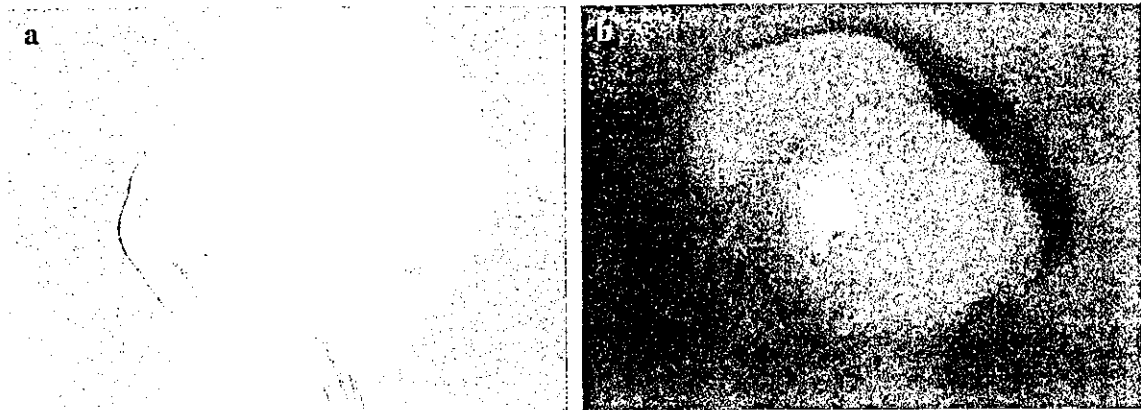


図9 *L-Maf*導入による異所性水晶体形成 (stage14に導入, stage28の所見)
 a: 頭部の透明な異所性水晶体組織, b: 同時に導入したGFPの発色により, *L-Maf*の発現部位がわかる。

異蛋白を発現し, *in vivo*で*L-Maf*の発現を抑制するとこれら水晶体特異蛋白の発現, ひいては水晶体の形成が抑制される。*L-Maf*は表面外胚葉が水晶体板から水晶体胞となって眼杯に向かって陥入する時期に発現して水晶体形成の場を決定し, 他のMaf family発現を誘導する。さらにその後は水晶体線維の形成にも関わり, 種々のクリスタリン (CRYD, CRYAA, CRYBB1) や水晶体線維特異蛋白の発現を誘導する²⁴⁾。

*L-Maf*の相同遺伝子はマウス, ヒトにおいて*MafA/MAFA*として同定された, MAF familyの変異が先天白内障の原因になることは指摘されているが²⁴⁾, *L-Maf/MafA*のヒト水晶体発生および疾患に変異はまだ明らかにされていない。

VII 水晶体特異蛋白の遺伝子

細胞の構造遺伝子としては, 水晶体特異蛋白である種々のクリスタリン (CRYAA²⁵⁾, CRYBA3/A1²⁶⁾, CRYAB²⁷⁾, CRYBB2²⁸⁾, CRYG²⁹⁾, CRYGD³⁰⁾, 細胞間gap junction channel蛋白 (Connexin 46³¹⁾, Connexin 50³²⁾, 細胞構成蛋白 (beaded filament protein gene BFSP2³³⁾, MIP³⁴⁾, 水晶体上皮アクアポリン³⁵⁾の変異によって先天白内障が起こることが次々に報告されている。これら構造蛋白は水晶体発生においては最終産物と言えるものであり, 水晶体に特異的に存在するので, 表現型は白内障のみであることが多い。興味深いことに, これらクリスタリン遺伝子を中心とした構造蛋白遺伝子

の変異では, 白内障混濁の形態に特徴があるとの報告が多い [posterior polar cataract (CRYAB); zonular cataract (CRYBA3/A1); cerulean cataracts (CRYGD) sutural cataracts (CRYG); pulverulent cataract (Connexin 50)], これらはまだ症例数が少ないので正確な相関はわからないが, クリスタリンは発生期に応じて発現するタイプが異なるので, 水晶体線維の成長や層形成に伴って特異な部位に混濁が起こることが考えられる。かつてJ. FrancoisやS. Duke-Elderの眼科教科書には先天白内障の形態分類が詳細に記載されていた。これらは一部を除いて顧みられることが少なくなっていたが, ふたたび脚光を浴びることになるかもしれない。

これらの遺伝子変異は最初にヒトで発見された例もあるが, マウスなどの動物で眼と遺伝子の異常が見つかり, ついでヒトでも疾患を起こすことが明らかになったものも多い³⁶⁾。

最近, マウスDNA分解酵素の1種がマウスの水晶体細胞で特異的に発現し, この欠損マウスでは核白内障が生じることが報告された³⁷⁾。したがって, このDNA分解酵素の変異がヒトでも先天白内障を起こす可能性がある。

VIII 原因遺伝子の発見による疾患概念の変化

これまで述べてきたように, 眼形成にはPax6を頂点とする遺伝子カスケードが存在し, 角膜を作る遺伝子群, 水晶体を作る遺伝子群, 網膜を作る遺伝子群などに

分かれていると考えられる。眼の形成に関わる遺伝子は膨大な数にのぼり、ショウジョウバエのような下等動物でも1,000を越えると試算されている³¹。水晶体形成カスケードは、*Pax6*が最上流に位置し、その下で*Eya*、*Pitx*や*L-Maf*が働き、最下流にクリスタリンなどの構造蛋白をコードする遺伝子が位置すると大まかながら推測されるが、この上下にも数多くの遺伝子が関与していると考えられる(図4)。このカスケード内の遺伝子のどれに変異があっても先天白内障が起こる可能性がある。言い換えれば、非常に多くの遺伝子が先天白内障の原因遺伝子として記載されるようになるであろう。今の技術では遺伝子変異のスクリーニングには膨大な労力を要し、また疾患概念の混乱にも通じかねない。網膜色素変性症では、原因遺伝子(おもに網膜視細胞の酵素や構造蛋白)が多数見付き、一方、同一遺伝子で白点状網膜炎のような異なる疾患が起こるなど、疾患概念の混乱が言われている。ネットワークの複雑さから考えて、発生に由来する疾患の概念の混乱ははるかに深刻である。

ただ、水晶体形成の遺伝子カスケードの位置によってある程度の違いはある。*Pax6*の変異では、その支配領域から考えて、眼のあらゆる部位で形成異常が起こり、表現型が白内障単独であることは稀である。*Eya1*、*Pitx*は前眼部の形成に関わるので、その変異では白内障とともに角膜、虹彩の異常を伴う。さらに、これまで見てきたように、転写因子など上流の遺伝子はまったくタイプの異なる臓器でも働くので(*Pax6*は中枢、*Eya1*は鰓弓、腎)、その変異は多臓器障害をもつ症候群を起こすことがある。しかし、クリスタリンなどの水晶体構造蛋白遺伝子の変異では、ほとんどが白内障のみを起こす。

遺伝子のほうから疾患の再分類を行おうとするのは、混乱を招くだけで領けない。また、先天異常の多くは遺伝病でなく、感染や炎症、中毒、環境の変化などによって起こることも注意すべきである。これまでに確立された疾患単位が臨床経過、合併症、治療方針の面で明確であることを考えれば、これを遵守し遺伝子の異常はその原因として検索し併記すべきものと考えられる。

IX 遺伝子治療、再生医学への応用

現在臨床に応用できるのはまず遺伝相談である。原因

遺伝子の候補が多数あるので、検索には労を要し、情報の告知や利用には注意が必要であるが、患者や家族が希望する場合は疾患の原因に関する有用な情報を得ることができる。

先天異常の遺伝子治療はきわめて困難である。ジストロフィで試みられているような正常(野生型)遺伝子の補充は、根本的治療にならない。白内障で補充療法ができたとしても、混濁が軽いか強いかの違いが起こるくらいで、手術が必要になるのであれば何にもならない。正常遺伝子を導入すると、本来存在する変異遺伝子を相対的に押さえることもあり、かえって変異遺伝子が強調されたり、他の遺伝子に影響を与えるような予想外の動きをすることも考えられる。変異遺伝子をそっくり正常遺伝子に置換する方法として、相同組み換え法があるが、組み換え効率が低いので今のところ非現実的である。一方、点突然変異では、変異部位を正常構造に置換する方法(DNA-RNAキメラオリヌクレオチド法)が近年報告された³⁸⁾。この方法は、修復させるべき塩基配列と、その前後にDNAとRNAを混在させたDNA-RNAキメラオリヌクレオチドを作製し、これを変異DNAに結合させると、DNAミスマッチ修復酵素によって、点変異が正常塩基に置換されるというものである。これによって、*in vitro*ではあるが、鎌状貧血の遺伝子校正に成功している。この遺伝子修復効率はきわめて高く、哺乳類細胞で30%にも達する。この方法の開発によって、先天異常の遺伝子治療が、概念的ではあっても可能となった。

むしろ、水晶体の形成に関わる遺伝子は再生医学へ応用されるほうが早いかもしれない。未分化幹細胞に遺伝子を適切に発現させれば、臓器ないしは組織の再生が可能となる。オートメーション工場のスイッチを押すようなもので、工場(細胞)の環境が良ければ、かなりの行程を進めることができる。自己細胞から組織を作れば拒絶反応も起こらない。*Pax6*遺伝子の異所導入によってアフリカツメガエルのオタマジャクシでは不完全な眼を作ることができ、その中には構造が乱れているが水晶体も存在している³⁹⁾。しかし、*Pax6*で水晶体を単独に作成した報告はまだない。*L-Maf*を用いれば、鶏胚組織に異所水晶体組織を作成することができる²⁵⁾。筆者らは*L-Maf*を鶏胚頭部に導入し、異所性の透明水晶体組織

を作成することに成功した。このような手法を用いれば、後発白内障を透明化したり、水晶体を再生させることが可能になると期待される。

おわりに

分子生物学の進歩により、水晶体形成に関わる遺伝子群と疾患におけるそれらの変異が明らかになってきている。水晶体の形成を理解するうえで、将来の再生医学応用に向けても、水晶体形成遺伝子カスケードとこれらを誘導するシグナル伝達物質など細胞環境の詳細を明らかにすることが現在の課題である。

文 献

- 1) Ton CCT, Hirvonen H et al : Positional cloning and characterization of a paired box-containing gene from the aniridia region. *Cell* **67** : 1059-1074, 1991
- 2) Halder G, Callaerts P, Gehring WJ : Induction of ectopic eye by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267** : 1788-1792, 1995
- 3) Gehring WJ : The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes to Cells* **1** : 11-15, 1996
- 4) Nishina S, Kohsaka S et al : PAX6 expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol* **83** : 723-727, 1999
- 5) Hanson IM et al : Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly. *Nat Genet* **6** : 168-173, 1994
- 6) Azuma N, Yamada M : Missense mutation at the C terminus of the PAX6 gene in ocular anterior segment anomalies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39** : 828-830, 1998
- 7) Mirzayans WG, Pearce IM et al : Mutation of the PAX6 gene in patients with autosomal dominant keratitis. *Am J Hum Genet* **57** : 539-548, 1995
- 8) Glaser T, Jepeal L et al : Pax6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet* **6** : 463-471, 1994
- 9) Azuma N, Nishina S et al : PAX6 missense mutation in isolated foveal hypoplasia. *Nat Genet* **13** : 141-142, 1996
- 10) Azuma N, Yamaguchi Y et al : Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic nerve malformations. *Am J Hum Genet* **72** : 1565-1570, 2003
- 11) Cvekl A, Kashanchi F et al : Transcriptional regulation of the mouse alphaA-crystallin gene : activation dependent on a cyclic AMP-responsive element (DE1/CRE) and a Pax-6-binding site. *Mol Cell Biol* **15** : 653-660, 1995
- 12) Gopal-Srivastava R, Cvekl A, Piatigorsky J : Pax-6 and alphaB-crystallin/small heat shock protein gene regulation in the murine lens : interaction with the lens specific regions, LSR1 and LSR2. *J Biol Chem* **271** : 23029-23036, 1996
- 13) Cvekl A, Sax CM et al : Pax-6 and lens-specific transcription of the chicken delta1-crystallin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 4681-4685, 1995
- 14) Richardson J, Cvekl A, Wistow G : Pax6 is essential for lens-specific expression of zeta-crystallin. *Proc Nat Acad Sci USA* **92** : 4676-4680, 1995
- 15) Duncan MK, Haynes JI et al : Dual roles for Pax-6 : a transcriptional repressor of lens fiber cell specific beta-crystallin genes. *Mol Cell Biol* **18** : 5579-5586, 1998
- 16) Cvekl A, Piatigorsky J : Lens development and crystallin gene expression : many roles for Pax-6. *BioEssays* **18** : 621-630, 1996
- 17) Sheng G, Thouvenot E et al : Direct regulation of rhodopsin 1 by Pax6/eyeless in *Drosophila* : evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev* **11** : 1122-1131, 1997
- 18) Xu PX, Woo I et al : Mouse Eya homologues of the *Drosophila* eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Development* **124** : 219-231, 1997
- 19) Azuma N, Yamada M et al : Mutations of a human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataract and ocular anterior segment anomalies. *Hum Mol Genet* **9** : 363-366, 2000
- 20) Semina EV, Reiter R et al : Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, *RIEG*, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet* **14** : 392-399, 1996
- 21) Semina EV, Ferrell RE et al : A novel homeobox gene *PITX3* is mutated in families with autosomal dominant cataracts and ASMD. *Nat Genet* **19** : 167-170, 1998
- 22) Ogino H, Yasuda K : Induction of lens differentiation by activation of a bZip transcription factor, L-Maf. *Science* **280** : 115-118, 1998
- 23) Reza HM, Yasuda K : Role of Maf family proteins in lens development. *Dev Dyn* **229** : 440-443, 2004
- 24) Jamieson RV, Perveen R et al : Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, MAF, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma. *Hum Mol Genet* **11** : 33-42, 2002
- 25) Litt M, Kramer P et al : Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene *CRYAA*. *Hum Mol Genet* **7** : 471-474, 1998
- 26) Kannabiran C, Rogan PK et al : Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities is associated with a splice mutation in the betaA3/A1-crystallin gene. *Mol Vis* **4** : 21, 1998
- 27) Berry V, Francis P et al : Alpha-B crystallin gene (*CRYAB*) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. *Am J Hum Genet* **69** : 1141-1145, 2001
- 28) Litt M, Carrero-Valenzuela R et al : Autosomal dominant cerulean cataract is associated with a chain termination

-
- mutation in the human beta-crystallin gene CRYBB2. *Hum Mol Genet* 6 : 665-668, 1997
- 29) Rogaeve EI, Rogaeve EA et al : Linkage of polymorphic congenital cataract to the gamma-crystallin gene locus on human chromosome 2q33-35. *Hum Mol Genet* 5 : 699-703, 1996
- 30) Nandrot E, Slingsby C et al : Gamma-D crystallin gene (CRYGD) mutation causes autosomal dominant congenital cerulean cataracts. *J Med Genet* 40 : 262-267, 2003
- 31) Mackay D, Ionides A et al : Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am J Hum Genet* 64 : 1357-1364, 1999
- 32) Berry V, Mackay D et al : Connexin 50 mutation in a family with congenital "zonular nuclear" pulverulent cataract of Pakistani origin. *Hum Genet* 105 : 168-170, 1999
- 33) Jakobs PM, Hess JF et al : Autosomal-dominant congenital cataract associated with a deletion mutation in the human beaded filament protein gene BFSP2. *Am J Hum Genet* 66 : 1432-1436, 2000
- 34) Berry V, Francis P et al : Missense mutation in MIP underlie autosomal dominant 'polymorphic' and lamellar cataracts linked to 12q. *Nat Genet* 25 : 15-17, 2000
- 35) Francis P, Chung JJ et al : Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts. *Hum Mol Genet* 9 : 2329-2334, 2000
- 36) Graw J, Loster J : Developmental genetics in ophthalmology. *Ophthalmic Genet* 24 : 1-33, 2003
- 37) Nishimoto S, Kawane K et al : Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature* 424 : 1071-1074, 2003
- 38) Yoon K, Cole-Strauss A, Kmeric EB : Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 2071-2076, 1996
- 39) Chow RL, Altmann CR et al : Pax6 induces ectopic eye in a vertebrate. *Development* 126 : 4213-4222, 1999

* * *

未熟児網膜症

あずま のり ゆき
東 範 行 国立成育医療センター眼科

要旨

未熟児網膜症は、低出生体重児の管理の進歩に伴って、近年増加しており、重症例も多くみられるようになった。定期的な眼底検査を行い、病期分類をよく理解して、重症例を見逃がさないことが重要である。治療は中等度網膜症であれば光凝固を、網膜剥離が進行すればバックリングや硝子体手術を行う。

はじめに

未熟児網膜症は発達途上の網膜血管が増殖する疾患で、重症であれば失明に通ずる。網膜血管は胎齢15週に視神経乳頭部に現れ、眼底を周辺部にむかって成長していく。血管が眼底の最周辺部まで達するのは満期の40週頃なので、発育途上で出生して急な環境変化があると、網膜血管は異常な方向に増殖する。したがって、網膜症の発現頻度や程度は血管成長が未熟であるほど高いが、ほかにも発病に関する多くの因子がある。未熟児網膜症は、NICUでの管理の進歩によって一時減少していたが、体重の少ない児が救えるようになって¹⁾再度増加し、重症網膜症も多くみられるようになった²⁾。

未熟児網膜症の進行と病期分類

未熟児網膜症の初期は、血管成長先端部の網膜内で血管芽細胞が増殖を始め、白い境界線を形成する(図1)。やがて境界線上やその後部で新生血管が発芽し、しだいに融合して硝子体腔内へ伸びていく(図2)。

眼底では乳頭は鼻側に位置しており、網膜血管が乳頭から周辺まで成長する距離は鼻側に比べて耳側が長いので、耳側のほうで網膜症がこりやすい。さらに進行すると、網膜剥離がお

Key Words

未熟児網膜症
病期分類
光凝固
硝子体手術

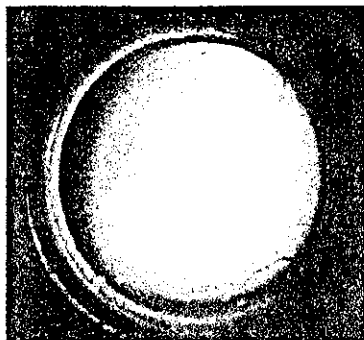


図1 境界線 (眼底写真)

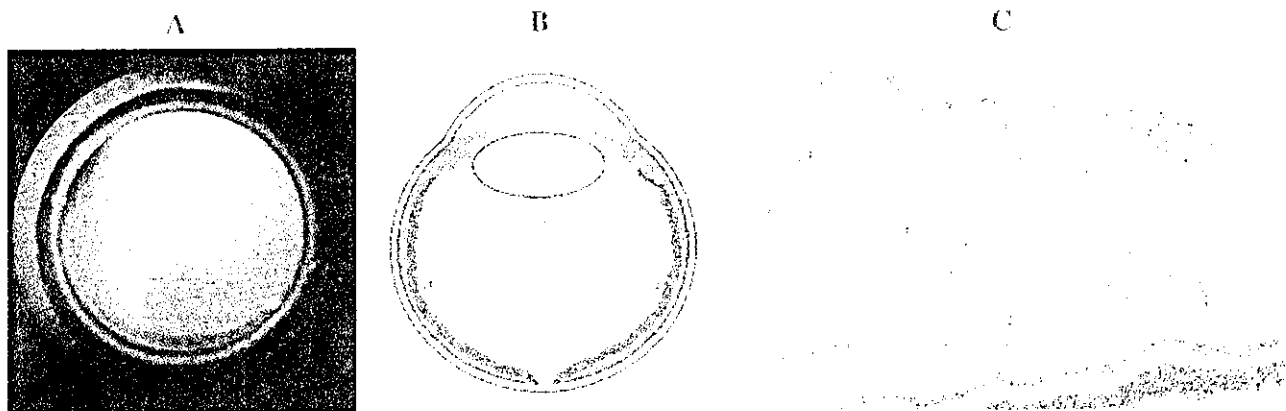


図2 発芽病変

A: 眼底写真, B: 眼球シエマ, C: 病理所見



図3 網膜ひだ

A: 眼底写真, B: 眼球シエマ

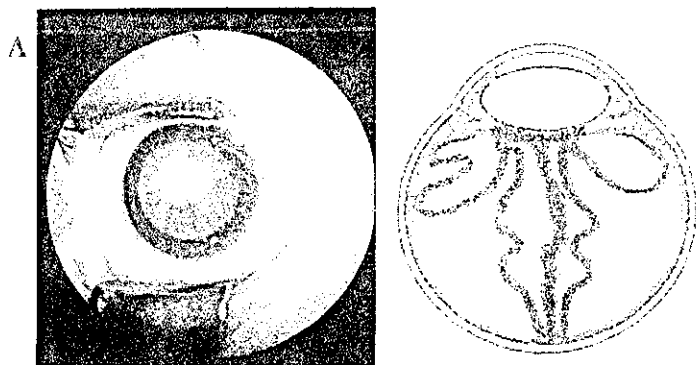


図4 白色瞳孔を示す高度な増殖による網膜全剥離

A: 眼球前方の写真, B: 眼球シエマ



図5 II型網膜症の後極血管の拡張と蛇行

こる。これは新生血管から形成された結合組織の収縮による牽引性剥離と、血管からの漏出による滲出性剥離の2種類がある。増殖組織が一侧に限局していれば、網膜はそちらに引かれて伸展し、牽引乳頭や網膜ひだ(図3)を形成する。

高度な増殖がおこれば網膜は全剥離し、白色

瞳孔を呈するようになる(図4)。ことに、網膜血管の成長が不良で拡張蛇行が強い場合は、短期間に進行して網膜全剥離になるおそれがある(厚生省分類Ⅱ型、図5)

この進行病期に関して、わが国では1976年に厚生省研究班によって『未熟児網膜症の診断ならびに治療基準』⁶⁾が作成され、1983年には一

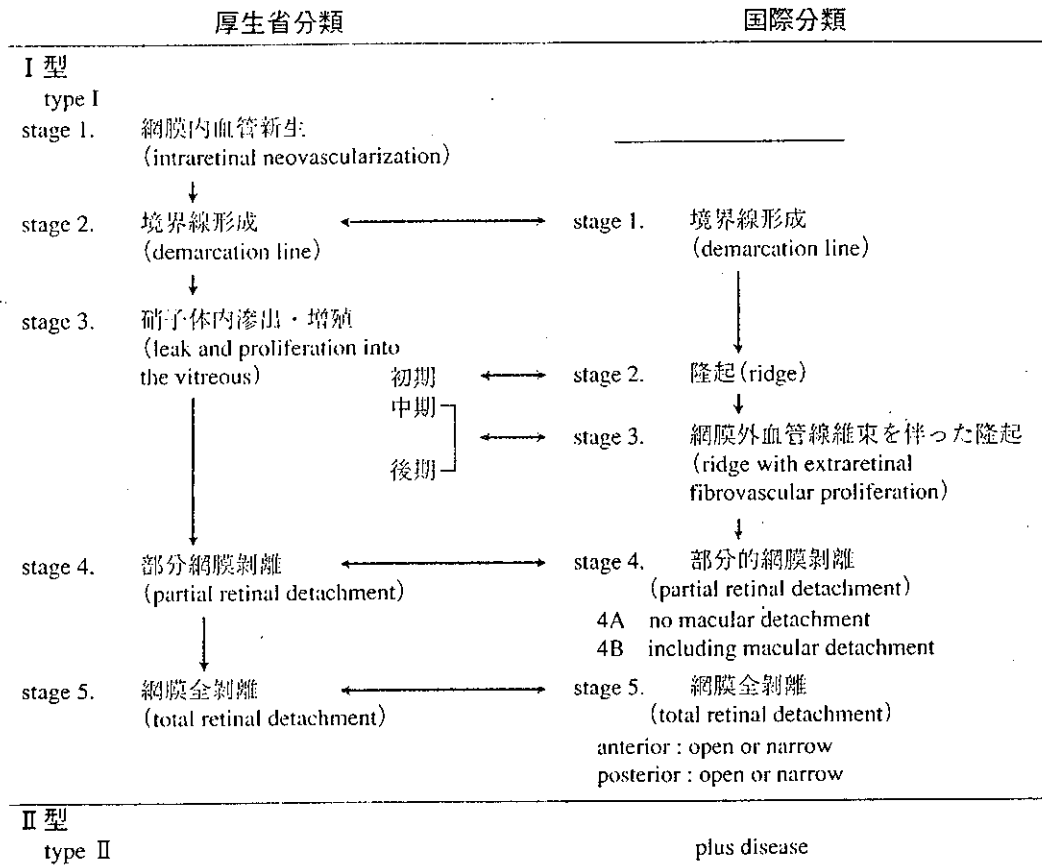


図6 厚生省分類と国際分類

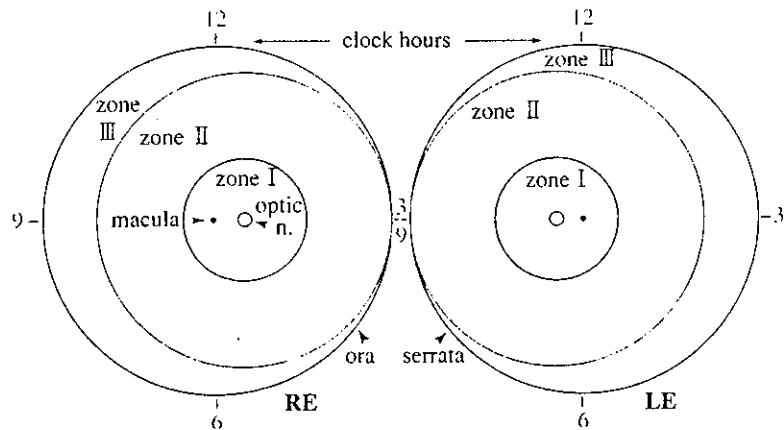


図7 国際分類の眼底 ZONE

部修正して、『未熟児網膜症厚生省新分類』⁷⁾となり、現在広く使われている。これと前後して、わが国を含む未熟児網膜症の研究者が集まって国際分類作成を行い、1984年⁸⁾と1987年⁹⁾に発表された。厚生省分類と国際分類はstage 1とstage 2の扱いが異なる。わが国では厚生省分類が広く定着しているが、国際分類への書き換えは容易である。両分類の比較を図6に示す。

国際分類では検査結果をコンピュータに入力可能にできるようにするため、stageを5期に分け、眼底を三つのzoneに分けて病変の局在と範囲を記載するようにした(図7)。一方、厚生省分類では急速に進行して網膜剥離に至る重症網膜症をII型としているが、国際分類ではこの概念がない。後極部静脈の怒張、動脈の蛇行、虹彩血管の充血や瞳孔強直が高度な場合は網膜症の進行が早く重篤なので、これを“plus” diseaseとして、『+』の記号をつけるようにしているが、厚生省分類II型とは異なる。最近、欧米でもこのII型が認識されるようになってきた。さらに、わが国では網膜症が寛解し瘢痕を残した場合の瘢痕期分類が作成されているが、国際分類では記載する瘢痕病変の項目のみにとどめている。

未熟児網膜症の発生に関与する因子

網膜血管は周産期に眼底周辺部に達するが、未熟な血管形成部は、数カ月にわたって原始的な毛細血管網から成人の形態に作り変えられ、通常生後2～3カ月に完成する。未熟児で出生した場合、出生と以後の環境の変化に伴うストレスによって、網膜内の発達過程にある毛細血管床が傷害され消失し、そこから新生血管がおこる。したがって、網膜症の発生にもっとも大きく関与する因子は網膜血管の未熟性であり、在胎週数が早いほど、出生時体重が少ないほど

重篤である¹⁰⁾¹¹⁾。

網膜症では、vascular endothelial growth factorなどの血管新生因子が網膜無血管領域から放出されて血管新生をおこすと考えられている¹²⁾¹³⁾。活動期に行われる光凝固や冷凍凝固治療は、この血管新生因子の産生と放出を抑えることが目的である。

酸素投与は網膜症発生の直接の原因ではないが、悪化させる要因である。初期の酸素投与に関する研究で、4週間高濃度酸素にさらされると網膜症の発生率が非常に増加することが示され、以後は酸素投与の厳重な管理や、抗酸化薬の外用、酸素フリーラジカル形成を促す光の曝露からの遮蔽などが行われてきた。しかし、これらの予防治法十分な解決策にはならなかった。経皮的に連続計測して酸素をコントロールしても網膜症の発生率や重症化を抑えることはできず、ビタミンE投与などによる酸化予防の試みでも、効果に一致した意見はみられない¹⁴⁾¹⁵⁾。

その他に、呼吸窮迫症候群、交換輸血、敗血症、脳室内出血、栄養や水分投与のアンバランスなど、呼吸や全身環境の異常に関与して網膜症を悪化させる因子として指摘されている¹⁶⁾¹⁷⁾。

眼底検査

眼底検査の開始時期については、米国で行われた冷凍凝固の多施設共同研究(CRYO-ROP Study)では出生体重1,300g以下、あるいは1,800g以下で補助的に酸素投与を行った低出生体重児には、すべてスクリーニング検査を行うことをすすめている。そして出生後7～9週に最初の検査を行えば活動性を有するものの、まだ重症に至っていない網膜症の大部分を発見することができる¹⁸⁾。普通は出生後4～9週に初回検査が行われていることが多い。

われわれは、在胎36週未満、出生体重が1,800g以下、あるいは高濃度酸素使用、手術を



図8 新生児病棟での眼底検査

行った場合をすべて検査対象としている。これは軽度の網膜血管成長不全をも把握するため、米国の基準より対象を広めにとっている。検査開始時期は、超未熟児の出生が増加していることから、全身状態が安定したら、ただちに、遅くとも出生後3週あるいは修正在胎30週前には初回検査を行う。

眼底検査は新生児病棟で行う。眼科医のほか、患児を抑制する者と、全身状態を観察する新生児科医師の2名の介助が必要である(図8)。

治療

1. 光凝固と冷凍凝固

網膜症が発症しても、厚生省新分類3期初期、あるいは国際分類 stage 2 までならば自然寛解し、視力予後もよい。しかし、さらに進行すれば網膜凝固を行う。これは無血管領域に汎凝固を行って血管新生因子の産生を抑制し、あわせて新生血管の増殖の場をなくして、網膜剥離発生の可能性を減少させることが目的である。わが国では早くから光凝固が行われており、良好な結果が得られている¹²⁾。米国では、はるかに遅れて、まずCRYO-ROP Studyによって冷凍凝固の有用性が証明され¹³⁾、最近になって光凝固が行われるようになってきた¹⁴⁾。しかも、米国のCRYO-ROP Studyでは失明予防を目的としているのに比べて、日本ではわずかな瘢痕すらもおこさず、有用な視力を確保することを目的とし

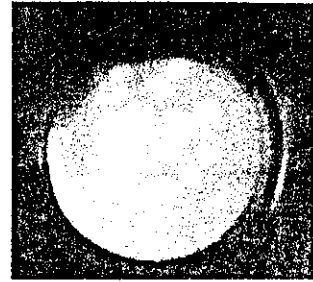


図9 倒像鏡アルゴンレーザーによる凝固斑

ており、凝固治療の時期が早い傾向にある。

光凝固はキセノンあるいはアルゴン/半動体レーザーによって行う。前者に比して後者のほうが効果は弱い¹⁵⁾が、古いキセノン光凝固装置をもっている病院はごくわずかとなっている。治療後はできるだけ頻回に眼底検査を行い、不足であれば凝固を追加する(図9)。冷凍凝固は術中の眼球障害のみならず、無呼吸発作や徐脈、血圧低下などの全身合併症をおこす危険性が高い。しかも凝固能が強いため、進行例では後に凝固縁に網膜裂孔を形成し、後の硝子体手術の予後を悪くする。

2. 網膜剥離に対する治療(バックリングと硝子体手術)

網膜症がさらに進行して網膜剥離に至った場合、恒久的な視力障害をおこす。これに対しては、まず強膜バックリング手術¹⁶⁾¹⁷⁾、ついで硝子体手術¹⁸⁾¹⁹⁾が行われる。バックリングは眼球の外にシリコンスポンジを縫いつけて眼球壁に陥入させ、牽引を軽減させて網膜剥離を治す方法である。しかし、おもに部分網膜剥離に対して行われ、全剥離に向かえば硝子体手術が必要となる。これは、眼内に小さい器具を挿入して網膜を牽引している増殖膜(瘢痕化した新生血管由来の膜組織)を除去し、網膜剥離を治す方法である(図10, 11)。

しかし、成人の網膜剥離と比べて非常に重篤なので治癒率は十分とはいえない。しかも、網膜の障害が非常に強いので、剥離が治っても視

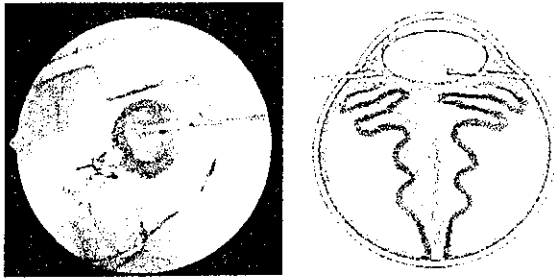


図10 硝子体手術
A: 眼球前方の写真, B: 眼球シエーマ

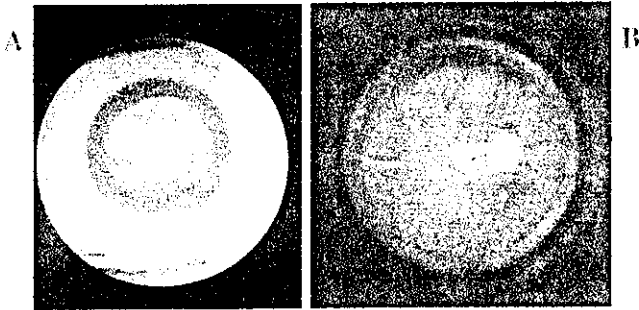


図11 硝子体手術前後
A: 術前白色瞳孔の眼球前方写真
B: 術後網膜が復位した眼底写真

力は光覚、手動弁程度しか得られないことも多い。硝子体手術は原則として、両眼に高度の剥離がある場合に、片眼ずつ行う。他眼が良好の視力が期待できる場合は、手術はすすめられない。たとえ光覚が得られてもその眼を使わないし、眼球の発育が悪ければ、将来は整容上から義眼を装用することになるからである。

手術時期は、網膜を復位させて視力発達を促すためには早期のほうが望ましいが、本症は手術を急ぐことはむしろ危険である。増殖膜内の血管の活動性が高く、術中に大出血をおこすと止血は不可能なので、瘢痕化が進んで増殖膜中の血管が十分に退縮するのを待ってから手術を行う。通常は網膜剥離がおこってから1~2カ月は待つことが多い。全身麻酔をかけられるか否かも大きな問題である。呼吸器も未熟で、麻酔はかけられても術後に抜管できず長期に呼吸管理をしなければならないこともある。新生児科や麻酔科と十分に相談して手術適応を決める。

晩期合併症に対する検査

光凝固後であれ自然寛解であれ、活動期を乗り切って網膜症が瘢痕化しても、眼底検査を定期的に行わなければならない。晩期合併症として、裂孔原性網膜剥離がおこる危険性がある。瘢痕が軽度であれば10歳代後半におこりやすいが、網膜ひだなど高度な牽引があれば、学童期でも裂孔が生ずる。ことに年少では片眼の視力低下に気づかないので、3~4カ月ごとに眼底検査を行い、眼球を打撲した場合は早期に受診するよう家族にすすめておく。

家族に対する説明とインフォームド・コンセント、ハビリテーション

未熟児網膜症は軽度であれば寛解するが、進行すれば失明につながることもあり、発生初期には予後がわからないことも多い。したがって家族に十分な説明を行っておくことが必要である。網膜症による視覚障害では、米国はもとより、わが国でも多数の訴訟がおこされており、医師は患児の治療のみならず、社会的な問題にも配慮しなければならない。通常、初回の眼底検査の際に、家族に未熟児網膜症の一般について説明し、現在の患児がどの状態にあるかを告げておくべきである。急に光凝固が必要になっても、すでに十分な説明がされていれば家族の納得がただちに得られる。硝子体手術のような予後が十分でない治療を行う場合は、ことにインフォームド・コンセントが重要である。

また、網膜の状態に応じて、できる限り視力を発達させるように努力するべきである。比較的視力が望めるのであれば屈折矯正や訓練などを積極的に行う。不幸にして視覚障害が重篤な場合には、日常生活や就学指導など種々の社会的問題が生ずる。発達遅滞などの重複障害も多