

執筆者一覧 (掲載順)

岡田秀親

福祉村病院長 寿医学研究所先端医療担当 副院長

藤田禎三

福島県立医科大学医学部免疫学講座 教授

今井優樹

名古屋市立大学大学院医学研究科免疫学分野 講師

岡田則子

名古屋市立大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

瀬谷 司

北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

長澤滋治

(前)北海道大学薬学研究生体機能科学分野 教授

松下 操

東海大学工学部生命化学科 教授

野中 勝

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 教授

中尾実樹

九州大学大学院農学研究院・生命機能科学部門 教授

柚本智軌

九州大学大学院農学研究院・生命機能科学部門 准教授

山本哲郎

熊本大学大学院生命科学研究部分子病理学分野 教授

松本美佐子

北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 准教授

関根英治

福島県立医科大学医学部免疫学講座 講師

高橋信二

女子栄養大学栄養学部微生物学研究室 教授

青柳祐子

女子栄養大学栄養学部微生物学研究室 専任講師

井上徳光

大阪府立成人病センター研究所分子遺伝学部門 部長

大井洋之

望星会鶴見西口病院 院長

畑中道代

神戸常盤大学保健科学部医療検査学科 教授

北村 肇

関西福祉科学大学健康福祉学部 教授

西坂浩明

北九州市立医療センター内科 部長

堀内孝彦

九州大学大学院病態修復内科学分野 准教授

山本哲郎

那珂川病院総合診療科 部長

木下夕口ウ

大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患研究分野 教授

遠藤守人

八戸大学人間健康学部 教授

鶴沼 智

東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科

南学正臣

東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科 特任講師

水野正司

名古屋大学大学院医学系研究科腎不全総合治療学
寄附講座 講師

高橋 実

福島県立医科大学医学部免疫学講座 助教

岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター
臨床研究センター分子細胞生物学研究部 部長

塚本 浩

九州大学大学院病態修復内科学分野 講師

大澤 勲

順天堂大学医学部腎臓内科学講座 准教授

松尾清一

名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科学 教授

目次

概説

1. 補体系の全体像

- 1-1 補体系の全体像 (岡田秀親) 10
感作ヒツジ赤血球 (EA) と比色計/properdin system/補体第二経路/種特異的補体制御膜因子/補体反応の役割

基礎編

2. 補体活性化と制御

- 2-1 補体活性化反応 (藤田禎三) 16
免疫系との関連/カスケード反応としての補体系/C3の中心的役割/補体系の働き/補体活性化の認識分子/補体活性化経路
- 2-2 後期経路 (今井優樹、岡田則子) 26
後期反応の開始/非酵素的反応によるC5b-9形成/MAC形成時の反応性細胞溶解の制御/宿主細胞上のMAC形成阻害作用を示す膜蛋白/病原微生物のMAC形成阻害作用を示す蛋白/CD59/HRF20発見の経緯/CD59/HRF20欠損とその生物活性/sublytic C5b-9形成と細胞活性化/内皮細胞におけるC7の発現と膜結合性TCCの新たな機能/補体後期経路と病態/補体後期経路のインヒビター
- 2-3 補体活性の制御(血清/細胞膜の補体制御因子) (瀬谷 司、長澤滋治) 39
H因子(CFH)/C4結合蛋白質(C4bp)/DAF(CD55)/MCP(CD46)/臨床応用
- 2-4 補体の産生 (松下 操) 49
補体成分産生の臓器・細胞
- 2-5-1 補体系の進化：無脊椎動物 (野中 勝) 55
動物の系統/補体因子固有のドメイン構造/刺胞動物の補体系と補体系の起源/前口動物の補体系/後口動物の補体系/TEP遺伝子の進化/一次構造の進化/補体系の進化過程
- 2-5-2 補体系の進化：脊椎動物 (中尾実樹、柚本智軌) 62
主な補体成分の分子進化/補体活性化経路の系統発生/今後の展望

3. 補体の生物活性

- 3-1 炎症 (山本哲郎) 68
炎症とは何か/臓器炎と膠原病/炎症反応と免疫反応/炎症反応に関与する細胞群/炎症のケミカルメディエーター(化学伝達因子)/補体由来のケミカルメディエーター/感染微生物に対する傷害作用や貪食に関与する補体因子/全身反応に関与する補体系因子
- 3-2 食細胞機能の増強 (松本美佐子) 79
C1qレセプター/CR1(CD35)/CR2(CD21)/CR3(CD11b/CD18)、CR4(CD11c/CD18)/CRIg
- 3-3 免疫複体の可溶化とクリアランス (関根英治) 88
補体による免疫複体の可溶化/補体受容体1(CR1)を介して肝臓や脾臓で処理される免疫複体/補体受容体1(CR1)の構造と発現/免疫複体病とは/免疫複体病の発症機序/血清病(serum sickness)/その他の免疫複体病

4. 免疫系における補体

- 4-1 自然免疫における補体 (高橋信二、青柳祐子) 95
感染防御の概要/自然免疫において補体が果たす役割/細胞外寄生性細菌に対する自然免疫における補体の役割

- 4-2 補体と獲得免疫 _____ (井上徳光) 104
補体と体液性免疫/補体と細胞性免疫

臨床編

5. 臨床と補体

- 5-1 臨床と補体 _____ (大井洋之) 116
血清の低補体が認められたとき/血清の高補体が認められたとき/3つの補体活性経路/局所への補体の関与/
臨床的研究

6. 補体欠損

- 6-1 補体異常の評価法 _____ (畑中道代、北村 肇) 119
補体の測定法/個々の成分における蛋白測定値と活性測定値の意味/データの解釈/補体異常症例の補体学的
解析法/経験した興味深い症例について
- 6-2 補体欠損と感染・自己免疫疾患 _____ (西坂浩明、堀内孝彦) 130
補体欠損症の臨床像/補体欠損と感染/補体欠損と自己免疫疾患
- 6-3 C1 インヒビター欠損と遺伝性血管性浮腫 (HAE) _____ (堀内孝彦、山本哲郎) 139
HAEの分類/HAEの疫学/HAEの臨床症状/HAEの病態/C1 インヒビターの遺伝子異常/HAEの検査/HAEの治療
- 6-4 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) _____ (木下タロウ) 148
血管内溶血のメカニズム: 補体系の自己非自己識別の破綻/DAFとCD59欠損のメカニズム: GPIアンカー生
合成の異常/GPIアンカーの生合成/GPI-GnT欠損を起こす遺伝子レベルの異常/PNHにおけるクローン性拡
大/Pig-a変異細胞の拡大と自己免疫性骨髄不全/PNHの3段階発症モデル/PNHクローンの良性腫瘍性拡大:
HMGA2遺伝子の活性化/PNHの検査/PNHの新しい治療法: ヒト化抗C5モノクローナル抗体(エクリズマブ)

7. 補体と疾患

- 7-1 IgA腎症 _____ (遠藤守人) 159
IgA腎症腎組織での補体成分の沈着/IgA腎症の補体活性化の初期反応/IgA腎症の多様性と補体反応/IgA腎症
における補体活性化反応とその制御/IgA腎症での補体反応による組織障害
- 7-2 膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) _____ (大井洋之) 165
補体系からみたMPGNの診断/MPGNの血清中に認めるC3NeF/C3NeF、低補体とMPGNの関係/MPGNにおけ
るC4NeFの出現/3つの異なった性質のC3NeF/自己免疫疾患としてのMPGN/H因子欠損症とMPGN
- 7-3 溶血性尿毒症症候群 (HUS) _____ (鶴沼 智、南学正臣) 171
aHUSとalternative pathway/各補体の遺伝子異常/aHUSの発症契機/aHUSの診断/aHUSの経過・予後/aHUS
の治療
- 7-4 血液透析と補体 _____ (水野正司) 177
透析膜や回路素材の生体適合性と補体/末梢血中の好中球減少と補体の活性化/マイクロバブル形成と補体の
活性化/凝固系と補体/ESRD患者のHDにより補体活性系の異常がもたらす、その他の影響の可能性
- 7-5 虚血性疾患と補体 _____ (高橋 実) 184
虚血再灌流での組織障害の機序/虚血モデル動物/補体初期活性化経路/古典経路の関与/レクチン経路の関
与/第二経路の関与/臓器特異的虚血再灌流の組織障害/ヒトにおける虚血性疾患

7-6 眼科と補体 (岩田 岳) 189
眼の基本的構造と機能/眼における補体の存在/角膜疾患と補体/ぶどう膜炎と補体/糖尿病網膜症と補体/視神経シナプスの構築と緑内障における補体/加齢黄斑変性と補体

7-7 SLEと補体 (塚本 浩) 194
補体欠損症とSLE/SLEの病態形成における補体の役割/SLE診療における補体系検査の解釈/補体の制御を介したSLEの治療

8. 病態と補体

8-1 クリオグロブリン (大澤 勲) 200
クリオグロブリン血症の原因疾患/クリオグロブリン血症の分類/クリオグロブリン血症の病態/クリオグロブリン血症の臨床症状/クリオグロブリン血症の検査結果/クリオグロブリンの検出方法/クリオグロブリン血症の治療/クリオグロブリン血症の予後

8-2 MACと尿蛋白 (遠藤守人) 205
糸球体におけるMAC形成とその制御/MACによる組織障害と尿蛋白/尿中C5b-9と尿蛋白

8-3 尿細管間質障害と補体 (松尾清一、水野正司) 210
背景/蛋白尿による尿細管間質障害と補体/膜補体制御因子と、C3a/C5aレセプターの腎での局在/尿細管局所における補体成分の産生とこれによる腎障害/補体による尿細管間質障害の機序/結語

8-4 プロペルジン (大澤 勲) 215
構造/産生/機能/臨床的意義/治療応用

8-5 cold activation現象 (北村 肇、畑中道代) 219
cold activation現象の特徴/低温による活性化の証明/補体プロフィール/頻度と疾患/血漿採取のための抗凝固剤について/活性化因子の本体/どんなときに疑うか、疑ったら何をするか?

索引 225

7-6 眼科と補体

岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター分子細胞生物学研究部 部長

はじめに

ヒトは情報の約8割を視覚情報に依存しており、生涯を通じて視機能を維持することは生活の質(QOL)を維持することに直結する重要な課題である。眼は外界に直接開かれていることから、感染や傷害からこの器官を守る必要があり、自然免疫系の重要な一角である補体が重要な役割を果たしている。眼は免疫特権部位 (immune privileged site) と呼ばれる臓器に分類され、通常の免疫炎症反応が起こると透明性を維持できなくなるため、炎症反応を最小限に抑え、眼の透明性と微細構造を保護する特性を備えている¹⁾。

補体は角膜や硝子体の炎症に関与し、さらに最近の研究から、加齢黄斑変性や緑内障などの有病率の高い眼科疾患の発症にも関与することが明らかにされてきた。特に補体の遺伝子多型が加齢黄斑変性の発症リスクを高めることが統計学的に証明され、眼球内の補体を抑制するための薬が複数の製薬会社で研究されている。本章では眼における補体の関与について、特に加齢黄斑変性を中心に、最近の知見を紹介する。

1. 眼の基本的構造と機能

眼球はほぼ球形であり、前方の角膜から後極の強膜までの距離は新生児で約17mm、成人では約24mmである。角膜、前房、虹彩などから構成される前眼部、水晶体、硝子体などの中間透光体、そして網膜、脈絡膜、視神経乳頭から構成される後眼部に分けられる(図1)。光は透明な角膜で屈折し、虹彩によって光量が調整されながら眼の中に取り込まれる。毛様体の筋肉によって水晶体の厚みが変わることによって光はさらに屈折

変化を起こして、無色・透明なゲル状の硝子体を通過し、網膜に結像する。網膜のほぼ中央に位置する黄斑の中心には視細胞が集中する中心窩が存在し、この高密度な視細胞の存在によって、一部の霊長類や鳥類には高い解像度の中心視力が確保された。視細胞で受容した光刺激は電気信号に変換されて、視神経、視交叉、視索を経て、後頭葉の視覚中枢に伝達され、映像として認知される。視神経は直径約3mmの神経の束であり、眼球を出ると有髄神経線維となって周囲からのノイズを遮断している。角膜から網膜までを保護する最外層の強膜は太さの不均一な膠原線維を中心とした細胞外基質で構成されている。

2. 眼における補体の存在

ヒトの主要な情報源である視覚情報を生涯にわたって受け取るために、眼は外界からの様々な危険に対して保護機能が用意されている。角膜から網膜までを光が通過するためには、規則的な分子・細胞の配列を乱すような炎症反応は大きな障害となる。眼の保護だけでなく、免疫特権部位としての機能を維持するためにも補体は重要な役割を担っている。これまでの研究報告によると、正常な眼球においてもiC3bやMACの存在が確認されており、補体は持続的に機能しているが、その活性は膜結合型補体制御因子によって厳密に制御されている²⁾。角膜、房水、涙液、そして網膜では古典経路と副経路と、これを制御するためのC1阻害因子(C1-INH)、DAF、MCP、CD59、I因子、H因子などの存在が確認されている³⁾。iC3bとそのレセプターは免疫特権部位を維持するために直接関与している⁴⁾。また、これらの補

体制御因子に対する抗体を投与すると重篤な炎症反応が生じることが報告されている。

3. 角膜疾患と補体

角膜は眼瞼や結膜とともに直接外界に露出しており、様々な微生物による感染や抗原によるアレルギーなどが発生する。角膜は無血管の透明な組織で、表裏はともに滑らかな非球面を構成しており、中央部の厚さは約0.5mmである。角膜の屈折率は1.37とほぼ水と等しく、光は角膜で強く屈折して眼球内に入る。角膜の表面は油層と水層からなる涙液層に覆われており、角膜上皮細胞を保護している。角膜は上皮、Bowman膜、実質、Descemet膜、内皮の5層に分かれている。上皮は5、6層の上皮細胞から構成されており、基底部の細胞は一定の間隔で分裂し、上方へ移動して、最終的には表層から脱落する。

角膜では、古典経路と副経路の補体因子(C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、プロペルジン、B因子)が確認されている。ヒトドナーの角膜にリポ多糖(LPS)、リビトールテイコイン酸、塩酸、水酸化ナトリウムなどを少量垂らし、アナフィラトキシン(C3a、C4a、C5a)の濃度を測定した実験によると、いずれの場合もアナフィラトキシンが検出されたが、いずれについてもMACは観察されなかった。コブラ毒因子(cobra venom factor)によってC3因子を阻害されたマウスの角

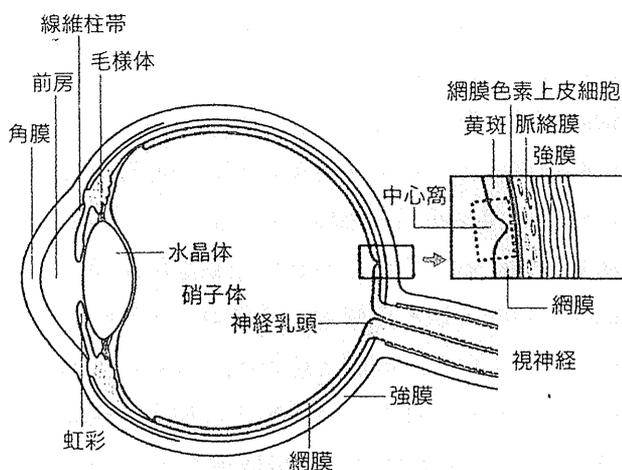
膜に緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)を感染させた実験では、炎症反応は観察されていない。さらに、遺伝子改変によってC5因子遺伝子が欠損したマウスにおいても炎症反応は観察されていない。炎症反応の行き過ぎから角膜を保護するために、MCP、DAF、Crry、CD59などの膜結合型補制御蛋白質が高発現しているが、感染する細菌によってはホスホリパーゼなどの酵素を産生し、角膜表面からDAFやCD59が脱落する危険性がある。角膜における可能性のある炎症抑制薬として、アナフィラトキシンをターゲットにした抑制薬が有効と考えられている。

4. ぶどう膜炎と補体

ぶどう膜は虹彩、毛様体、脈絡膜から構成されており(図1)、これらの組織はメラニン色素と血管が非常に豊富で、その色調がぶどうに似ていることからぶどう膜と総称されている。ぶどう膜炎は炎症の発生部位により、4つの病型(前部、中間部、後部、汎ぶどう膜炎)に分類されている。ぶどう膜炎は発生部位における炎症から白内障、緑内障、嚢胞様黄斑浮腫などへと周辺へ病気が進行する場合もある。日本人のぶどう膜炎の原因としては、ベーチェット病(Behçet disease)が約10~20%、サルコイドーシスが約10~20%、フォクト・小柳・原田病(Vogt-Koyanagi-Harada disease)が約5~10%、そして原因不明が約40~50%を占める。

この疾患と補体との関連についてはまだ十分な研究がなされていないが、ぶどう膜炎患者の房水中のC3bやC4bが検出されている。ぶどう膜炎の根本的な原因はまだ明らかにされていないが、モデル動物を用いた研究によって自己免疫疾患であることが明らかにされている。実験的に作製された自己免疫性ぶどう膜炎(experimental autoimmune anterior uveitis: EAAU)のモデル動物においてもC3bの上昇が観察されている。この動物モデルはウシのメラニンに結合した抗原を完全フロイトアジュバントを用いてマウスや

図1 ●眼の基本的構造



ラットの大腿部皮下に注射し、12～14日後に虹彩、毛様体の炎症から始まり、16～19日後には網膜の炎症を誘発する方法である。C3bとCR3との相互作用が発症機序に深く関係していると考えられており、抗CR3抗体を静注することによってモデル動物の発症を予防できることが報告されている。補体の活性化は複数のサイトカイン、ケモカイン、接着分子の発現を上昇させ、同時にIFN- γ 、IL-10、IP-10、ICAM-1、LECAM-1などが減少することから、ぶどう膜炎の発症には補体制御蛋白質一群の関与が考えられる。

5. 糖尿病網膜症と補体

糖尿病網膜症は糖尿病の3大合併症の1つで、中途失明原因1位の眼科疾患である。糖尿病を主原因として、網膜毛細血管の増殖とこれを構成する周辺細胞の脱落および内皮細胞の浸透性の増加によって、未熟な血管から血液が漏れてくることにより、広範囲の視神経障害が発生する。この疾患においても補体の関与が報告されている。MACやC3dの免疫染色は陽性であるが、古典経路やレクチン経路に関係するC1qやC4の免疫染色は確認されていないことから、副経路の関与が示唆されている。しかしながら、糖尿病患者の硝子体中にB因子、C3、C4b、C9などが検出されていることから、発症晚期においては古典経路の活性化も発生していることになる。

6. 視神経シナプスの構築と緑内障における補体

緑内障は、視細胞が光から変換した電気信号を脳に伝える視神経が障害され、高眼圧あるいは正常眼圧において、視神経乳頭の陥凹、視神経の萎縮、特徴的な視野狭窄を来す疾患として定義されている。眼圧を十分に下げることによって進行を防止あるいは遅延させることができることが多いが、根源的な治療法ではなく、その発症原因の解明が急務である。近年行われた日本緑内障学会と岐阜県多治見市による疫学調査(多治見スタ

ディー)によると、40歳以上における有病率は5%で、70歳以上の高齢者になると15%に上昇すると報告されている。また角膜と虹彩の間(隅角)が開放状態の開放隅角緑内障患者において、その9割が正常眼圧であったと報告されている。初期には自覚症状がほとんど現れないので、潜在的な患者数は多いと予測されている。

緑内障の障害は神経節細胞の萎縮が主原因であるが、近年の研究によって視神経シナプスの形成から緑内障による視神経の消失においても補体が関係していることが明らかになってきた。神経節細胞はその発生過程で網膜から視覚情報を処理する外側膝状体(lateral geniculate nucleus: LGN)へ投射し、シナプスを形成するが、生後数週間は必要なシナプスを選択的に残して残りは消失する。C1qあるいはC3の欠損マウスではこの選択が障害され、精巧に機能する視神経が形成されないことが明らかにされた³⁾。また、緑内障のマウスモデルを用いて外側膝状体の切片を観察するとC1qの発現が抑制されていることが報告されている。

7. 加齢黄斑変性と補体

加齢黄斑変性は中心視野が障害される加齢性の眼科疾患で、厚生労働省によって難治性疾患に指定されている。米国では失明率が最も高い疾患であり、わが国でも生活の欧米化や急速な高齢化、そして診断法の確立によって患者数は増加している。黄斑の中心に位置する中心窩には色を感じる錐体細胞が高い密度で存在し、これによってヒトは高い解像度の中心視力を得ている。中心窩では大量の視覚情報が通過・処理されており、この生理機能を維持するために、血管の豊富な脈絡膜と神経網膜との間で盛んに酸素、栄養素、老廃物の交換が行われている。網膜と脈絡膜の境界には網膜色素上皮細胞が存在し、分子輸送に加えて視細胞の貪食作用や各種因子の分泌機能などを併せもって網膜の恒常性を維持している。この細胞層が老化によって機能低下すると、細胞内で十分に

分解・処理できず、これが細胞外へ放出されて、ドルーゼンとして網膜色素上皮細胞とブルッフ膜の間に蓄積する(図2)。

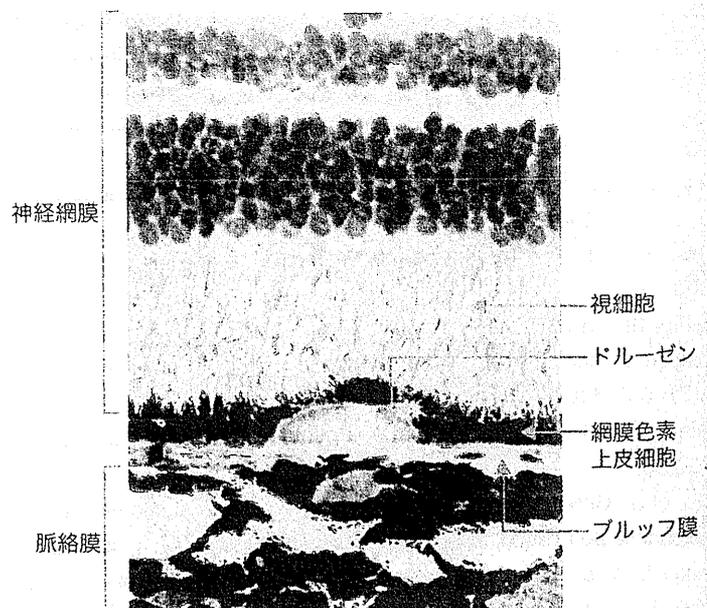
ドルーゼンの蓄積が黄斑を中心に広範囲に及ぶと、これに接する網膜色素上皮細胞は徐々に萎縮し、黄斑部の視細胞も障害されて萎縮型加齢黄斑変性となる。これは脈絡膜から視細胞に向かって黄斑部で血管新生が起こる滲出型加齢黄斑変性と区別される。萎縮型は白人での頻度が高く、滲出型は日本人に多いことが知られている。ドルーゼンの生成メカニズムはまだ十分に解明されていないが、遺伝子多型、視細胞を保護する不飽和脂質(DHA)の光酸化分子に対する自己抗体、アミロイドβの蓄積によるマクロファージの誘導、ウイルス感染による炎症など複数の原因が考えられている。この結果、ドルーゼンや網膜色素上皮細胞に補体の活性化が確認されており、患者の網膜切片の免疫染色によって補体関連分子の陽性反応が観察されている。萎縮型の患者の一部は滲出型へ移行することが知られているが、その詳細なメカニズムは不明のままである。加齢黄斑変性のリスク因子として、遺伝子、加齢に加えて、喫煙、肥満、青色光などが知られている。

加齢黄斑変性と補体との関連が注目されたのは、患者の網膜切片において、ドルーゼンや網膜色素上皮細胞に補体の活性因子や抑制因子が免疫染色によって確認されてからである⁶⁾。さらに、その数年後にはアメリカ人の患者を対象に行われた全ゲノム相関解析(genome wide association study : GWAS)によって、H因子(CFH)、B因子(CFB)、C2、C3などの遺伝子多型(single nucleotide polymorphism : SNP)が発症と相関することが明らかにされた⁷⁾。この中でも、特にH因子のY402H(rs1061170)の遺伝子多型は白人やヨーロッパ系インド人において多くの患者について相関したのに対して、日本人や中国人ではY402Hの相関は観察されず、I62V(rs800292)が一

部の患者で相関する程度であった⁸⁾。今後のアジア人におけるH因子の遺伝子多型が注目される。Y402HはH因子の反復配列(short consensus repeats : SCRs)の7番目にあり、C3b、C反応性蛋白(C-reactive protein)、グリコサミノグリカンとの結合部位に位置し、副経路の制御に影響すると考えられる。H因子のノックアウトマウス(*cfh*^{-/-})では視細胞の障害、網膜におけるC3の蓄積、ブルッフ膜の菲薄化が観察されている。

以上の事実から、補体の活性化を抑制することによって加齢黄斑変性を治療することが考えられ、多くの補体抑制薬が臨床試験でその薬効が評価されている。黄斑は一部の霊長類と鳥類にしか存在しないために、厳密には一般的な実験動物(マウス、ラット、モルモット)では黄斑に関する実験はできない。筆者らは独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターとの共同研究によって、若年で患者と同成分のドルーゼンを生成する遺伝性の黄斑変性カニクイザルを解析している。この疾患サルにおいて、ヒトと同様にドルーゼンや網膜色素上皮細胞において補体の活性化が観察されている⁹⁾。筆者らは補体を抑制することによってドルーゼンの生成を抑制あるいは消滅できるか、C3b (Compstatin, John Lambris)

図2 ●神経網膜と脈絡膜の間に蓄積するドルーゼン



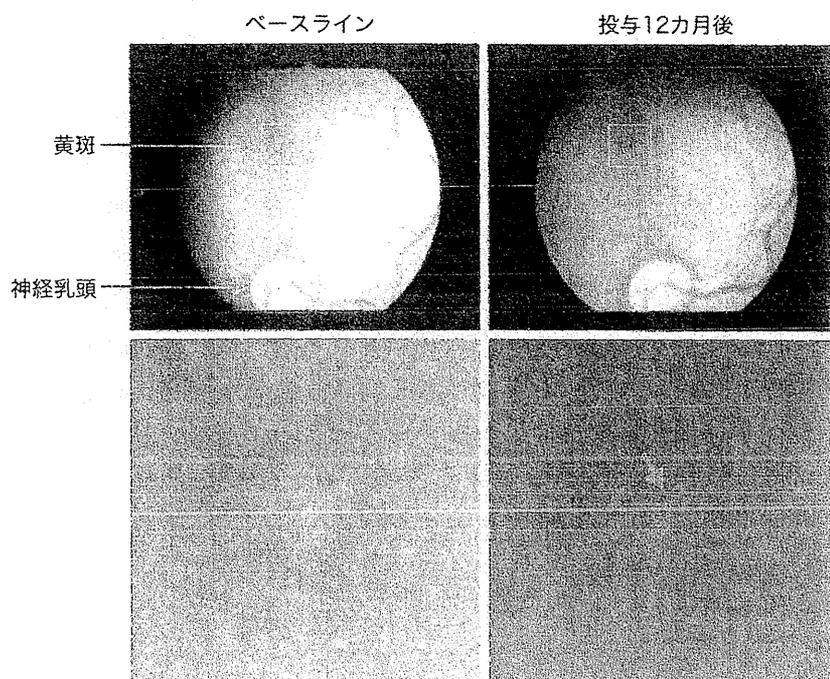
およびC5b (AcPepA、岡田秀親) 抑制薬の効果を研究中である。先行している Compstatin については、実験に用いた4頭全頭について、一部のドルーゼンについて消失していく様子が観察された(図3)。AcPepAについても同様な研究結果が期待されている。

おわりに

補体は眼を感染から守る防御機構であると同時に視神経の構築にもたずさわる重要な役割を果たしている。本項で紹介したように、補体は多くの眼科疾患に関与しており、診断への応用のほか、補体の活性化を制御することによる予防法や治療

法が期待されている。すでに他の疾患用に開発された補体抑制薬が眼科疾患への応用を目的として、数多くの臨床試験が進行中である。しかしながら、眼の特性からこれらのすべての薬が利用できるわけではなく、また患者の負担を軽減するためにも、その投与方法の工夫が必要と考えられる。情報の約8割を担う視機能の維持は生活の質と直結しており、眼における補体の機能をさらに深く研究する必要性を訴えたい。

図3 ● 補体抑制薬によるドルーゼンの縮小



文献

- 1) Niederkorn JY. Immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Crit Rev Immunol* 2002; 22(1): 13-46.
- 2) Sohn JH, et al. Chronic low level complement activation with the eye is controlled by intraocular complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(11): 3492-3502.
- 3) Bora NS, et al. Differential expression of the complement regulatory proteins in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(13): 3579-3584.
- 4) Sohn JH, et al. Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat Med* 2003; 9(2): 206-212.
- 5) Stevens B, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 2007; 131(6): 1164-1178.
- 6) Mullins RF, et al. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 2000; 14(7): 835-846.
- 7) Klein RJ, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308(5720): 385-389.
- 8) Goto, et al. Genetic analysis of typical wet-type age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese population. *J Ocul Biol Dis Infor* 2009; 2(4): 164-175.
- 9) Umeda S, et al. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J* 2005; 19(12): 1683-1685.
- 10) Chi Z, et al. Suppression of drusen formation by compstatin, a peptide inhibitor of complement C3 activation, on cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. *Current Topics on Complement and Eye Disease. Adv Exp Med Biol* 2010; 703: 127-135.

補体への招待

概説

- 1 補体系の全体像
- 1-1 補体系の全体像

基礎編

- 2 補体活性化と制御
 - 2-1 補体活性化反応
 - 2-2 後期経路
 - 2-3 補体活性の制御
 - 2-4 補体の産生
 - 2-5 1. 補体系の進化：無脊椎動物
2. 補体系の進化：脊椎動物
- 3 補体の生物活性
 - 3-1 炎症
 - 3-2 食細胞機能の増強
 - 3-3 免疫複合体の可溶化とクリアランス
- 4 免疫系における補体
 - 4-1 自然免疫における補体
 - 4-2 補体と獲得免疫

臨床編

- 5 臨床と補体
 - 5-1 臨床と補体
- 6 補体欠損
 - 6-1 補体異常の評価法
 - 6-2 補体欠損と感染・自己免疫疾患
 - 6-3 C1インヒビター欠損と遺伝性血管性浮腫 (HAE)
 - 6-4 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH)
- 7 補体と疾患
 - 7-1 IgA腎症
 - 7-2 膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN)
 - 7-3 溶血性尿毒症症候群 (HUS)
 - 7-4 血液透析と補体
 - 7-5 虚血性疾患と補体
 - 7-6 眼科と補体
 - 7-7 SLEと補体
- 8 病態と補体
 - 8-1 クリオグロブリン
 - 8-2 MACと尿蛋白
 - 8-3 尿細管間質障害と補体
 - 8-4 プロペルジン
 - 8-5 cold activation現象



9784758300384



1923047045003

ISBN978-4-7583-0038-4
C3047 ¥4500E

メジカルビュー社

定価 (本体 4,500 円+税)

A new mutation in the *RP1L1* gene in a patient with occult macular dystrophy associated with a depolarizing pattern of focal macular electroretinograms

Takenori Kabuto,¹ Hisatomo Takahashi,¹ Yoko Goto-Fukuura,¹ Tsutomu Igarashi,² Masakazu Akahori,³ Shuhei Kameya,¹ Takeshi Iwata,³ Atsushi Mizota,⁴ Kunihiko Yamaki,¹ Yozo Miyake,^{5,6} Hiroshi Takahashi²

¹Department of Ophthalmology, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital, Chiba, Japan; ²Department of Ophthalmology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan; ³Division of Molecular & Cellular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan; ⁴Department of Ophthalmology, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan; ⁵Department of Ophthalmology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan; ⁶Aichi Medical University, 21 Yazakokarmata, Nagakute-cho, Aichi, Japan

Purpose: To determine whether a mutation in the RP1-like protein 1 (*RP1L1*) gene is present in a Japanese patient with sporadic occult macular dystrophy (OMD) and to examine the characteristics of focal macular electroretinograms (ERGs) of the patient with genetically identified OMD.

Methods: An individual with OMD underwent detailed ophthalmic clinical evaluations including focal macular ERGs. Mutation screening of all coding regions and flanking intron sequences of the *RP1L1* gene were performed with DNA sequencing analysis in this case with OMD.

Results: A new *RP1L1* mutation (c.3596 C>G in exon 4) was identified. The variant c.3596 C>G in exon 4 resulted in the substitution of cysteine for serine at amino acid position 1199. The serine at position 1199 is well conserved among the *RP1L1* family in other species. Four out of five computational assessment tools predicted that this mutation is damaging to the protein function. This mutation was not present in 294 control alleles. The waveform of focal macular ERGs recorded from the patient with OMD had a depolarizing pattern, simulating the ERG waveforms observed after the hyperpolarizing bipolar cell activity is blocked.

Conclusions: We have demonstrated in a Japanese patient the possibility that sporadic OMD may also be caused by an *RP1L1* mutation. The waveform of focal macular ERGs elicited from the OMD patient with the *RP1L1* mutation showed a depolarizing pattern. This characteristic is the same as reported for the focal macular ERGs of OMD.

Occult macular dystrophy (OMD; OMIM 613587) is an inherited macular dystrophy characterized by a progressive decrease in visual acuity with an essentially normal fundus and normal fluorescein angiograms [1,2]. The full-field electroretinograms (ERGs) are normal; however, the focal macular ERGs and multifocal ERGs (mfERGs) recorded from the macular area are abnormal [1-3]. Despite normal ophthalmoscopic findings, spectral domain-optical coherence tomography (SD-OCT) has shown morphological changes in the retina in the macular area [4-8]. Several studies have reported various degrees of disruption of the inner segment/outer segment (IS/OS) junction and the cone outer segment tip (COST) line [4-8].

The hereditary form of OMD is an autosomal dominant trait; however, sporadic patients have also been reported [3, 9]. The gene responsible for the disease was recently identified as the RP1-like protein 1 (*RP1L1*) in four families

with autosomal dominant OMD [10]. The *RP1L1* gene has been identified through sequence analyses of human and mouse genomes [11,12]. The human *RP1L1* gene is encoded in four exons that span 50 kb on chromosome 8p. The length of the mRNA of *RP1L1* is more than 7 kb, but the exact length varies among individuals because of the presence of several length polymorphisms. *RP1L1* encodes a protein with a minimal length of 2,400 amino acids and a predicted weight of 252 kDa.

The expression of *RP1L1* is limited to the retina, and appears to be specific to photoreceptors [12]. The *RP1L1* gene was also found to be conserved in distant vertebrates [11]. Knockout mice lacking the *RP1L1* protein have reduced ERG amplitudes and progressive photoreceptor degeneration [13]. The study of *RP1L1*^{-/-} mice also showed that the *RP1L1* protein is located in the axoneme of the outer segments and connecting cilia exclusively in rod photoreceptors. The *RP1L1* protein appears not to be expressed in cone photoreceptors in mice, although more than 97% of the photoreceptors in mice are rods [13]. However, immunohistochemical analysis of the *RP1L1* of *Cynomolgus* monkeys with the human *RP1L1* antibody showed that *RP1L1*

Correspondence to: Shuhei Kameya, Department of Ophthalmology, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital, 1715 Kamagari, Inzai, Chiba 270-1694, Japan; Phone: +81 476 99 1111; FAX: +81 476 99 1923; email: shuheik@nms.ac.jp

was expressed in rod and cone photoreceptors [10]. Because the amino acid sequence of human RPIL1 is only 39% identical to that of the mouse, researchers have suggested that the primate RPIL1 might have different functional roles in the cone photoreceptors of the retina than that of other species [10].

We have identified a new mutation in the *RPIL1* gene in a patient with clinical characteristics of OMD: abnormal focal macular ERGs and blurring of the IS/OS junction and the disappearance of the COST line in SD-OCT images. The fundus examination, fluorescein angiograms, and full-field ERGs were normal in this case. The mutation is an amino acid substitution of cysteine for serine in exon 4 of the *RPIL1* gene that has not been reported in the Single Nucleotide Polymorphism (SNP) database and was also not detected in any of the 294 normal control alleles. The serine at position 1199 is well conserved among the RPIL1 family in other species. Four out of five computational assessment tools (PolyPhen-2, SIFT, PMut, Align GVGD, and MutationTaster) predicted that this mutation is damaging to the protein function. A segregation of the mutation and the disease was found in one affected member and one unaffected member of the same family.

METHODS

The protocol conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the Institutional Review Board of the Nippon Medical School and the ethics review committees of the National Hospital Organization Tokyo Medical Center. Written informed consent was obtained from all patients after the nature and possible consequences of the study were explained.

Clinical studies: The ophthalmological examinations included best-corrected visual acuity (BCVA) measurements, refraction, slit-lamp biomicroscopy, ophthalmoscopy, fundus photography, perimetry, SD-OCT, fluorescein angiography (FA), full-field ERGs, focal ERGs, and mfERGs. The visual fields were determined with the Goldman perimetry and the Humphrey Visual Field Analyzer (model 745i; Carl Zeiss Meditec, Inc., Dublin, CA). The Swedish interactive threshold algorithm standard strategy was used with program 30-2 of the Humphrey Visual Field Analyzer. The OCT images were recorded using a SD-OCT (Carl Zeiss Meditec) on this patient and normal controls. Full-field scotopic and photopic ERGs were recorded using an extended testing protocol incorporating the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision standards [14]. The full-field ERGs were used to assess retinal function under scotopic and photopic states.

Focal macular electroretinograms: Focal macular ERGs were recorded with a commercial Focal Macular ERG system (ER80; Kowa Company, Tokyo, Japan, and PuREC; Mayo Company, Nagoya, Japan) using a bipolar contact lens

electrode (MY type Electrode; Mayo Company). The stimulus and background lights were integrated into an infrared fundus camera [15-17]. The size of the stimulus spot was 15° in diameter and was placed on the macula by observing the infrared image of the retina on a monitor. The white stimulus and background illumination were generated by light-emitting diodes that had maximal spectral emissions at 440 to 460 nm and 550 to 580 nm, respectively. The luminances of the stimuli and background were 115.7 cd/m² and 8.0 cd/m². The duration of the stimulation was 100 ms. The responses were amplified and filtered with digital band pass filters from 5 to 200 Hz. Three hundred responses were summed with a stimulus frequency of 5 Hz. The a-wave, b-wave, d-wave, and oscillatory potentials (OPs) were evaluated.

Multifocal electroretinograms: The mfERGs were recorded using a commercial mfERG system (LE-4000, Tomey, Nagoya, Japan; LE4100; Mayo Company, Inazawa, Japan). This system uses basically the same technology as the Visual Evoked Response Imaging System [18]. The visual stimuli consisted of 37 hexagonal elements with an overall subtense of approximately 50°. The luminance of each hexagon was independently modulated between black (2.47 cd/m²) and white (200.4 cd/m²) according to a binary m-sequence at 75 Hz. The surround luminance was set at 75.4 cd/m².

Mutation analysis: Blood samples were collected from the patient, and genomic DNA was isolated from peripheral white blood cells using a blood DNA isolation kit (NucleoSpin Blood XL; Macherey Nagel, Düren, Germany). The DNA was used as the template to amplify the *RPIL1* gene. Coding regions and flanking introns of the *RPIL1* gene were amplified with polymerase chain reaction (PCR) using primers produced by Greiner Bio-One (Tokyo, Japan). Primer sequences are listed in Table 1. The PCR products were purified (ExoSAP-IT; USB Corp., Cleveland, OH) and were used as the template for sequencing. Both strands were sequenced on an automated sequencer (Bio Matrix Research; Chiba, Japan). The identified mutations and coding polymorphisms were assayed in 294 control chromosomes from 147 healthy Japanese individuals with direct sequencing except the length polymorphism region. To sequence the length polymorphism region of the *RPIL1* gene, the amplified PCR products were subcloned into the StrataClone PCR cloning vector (Stratagene; La Jolla, CA). At least five cloned products from this case and 20 control individuals were sequenced on an automated sequencer.

Computational assessment of missense mutation: The effect of a missense mutation on the encoded protein was predicted with the PolyPhen-2, SIFT, PMut, Align GVGD, and MutationTaster online tools [19-24]. PolyPhen-2 is a software tool that predicts the possible impact of amino acid substitutions on the structure and function of human proteins using straightforward physical and evolutionary comparative

TABLE 1. SEQUENCES OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS USED IN THIS STUDY AND PCR PRODUCT SIZE.

Fragment name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product size (bp)
RPIL1-2A	GAGACAGGAAATGCCAATCC	CCGCAACTGCTGAGCAGTGG	471
RPIL1-2B	CCTCTGCTCTGATAAGAAGC	TCCATGTGAGTATTTGACC	373
RPIL1-3	CCTCCAGCTAGTGATAGAGG	GATTGACAGTACTGAGAAGG	498
RPIL1-4A	TTCCTTTATCCTGATGCTGC	CCAAAGACTTCCCTGCATCC	509
RPIL1-4B	TGTGGGAGGGCTACCCCTGG	GCTGACGAGTCCGAAGAAGC	508
RPIL1-4C	CTATGCATAGATGGAGCAGG	GTTACAGAGGAGTCCAGTGG	536
RPIL1-4D	CAATGTCTCACCAGCAGC	TCCAACCTGCAGAACCAAGG	494
RPIL1-4E	GACTCTGTCAAATCTGG	GGACACCCTCTCCTGATTGG	784
RPIL1-4F	GGACAGCAGTCCCCTGGAAGG	ACTGCACCGCCTCTTCTTGC	937
RPIL1-4G	AAACACAGTGCAAGAAGAGG	AGGCTCAAGCTGGGAGCCACTCTGC	variable
RPIL1-4H	GGGAAAGGCTCCCAGGAAGTGACC	TTCTGCACCTTCTGACTCTGGCTGG	1470
RPIL1-4I	CACAGAGGAACCCACAGAGC	GAGAAGGCCGAGAGGTTTCG	522
RPIL1-4J	CAAGAGAGAGCTCCAGAAGC	TCTGTTGAGTCTCTGGCTCC	547
RPIL1-4K	GACAAAGATCCAAACTCGG	AGAGTCAGAAGATGTAGAGG	836
RPIL1-4L	TGAAGGGGAGATGCAAGAGG	GAGTGGCCTGTCTCAGGGACTGG	821
RPIL1-4M	AGGCTTCTGAAAGCAGCAGC	ACTATGGACATCTCCAGTGG	517

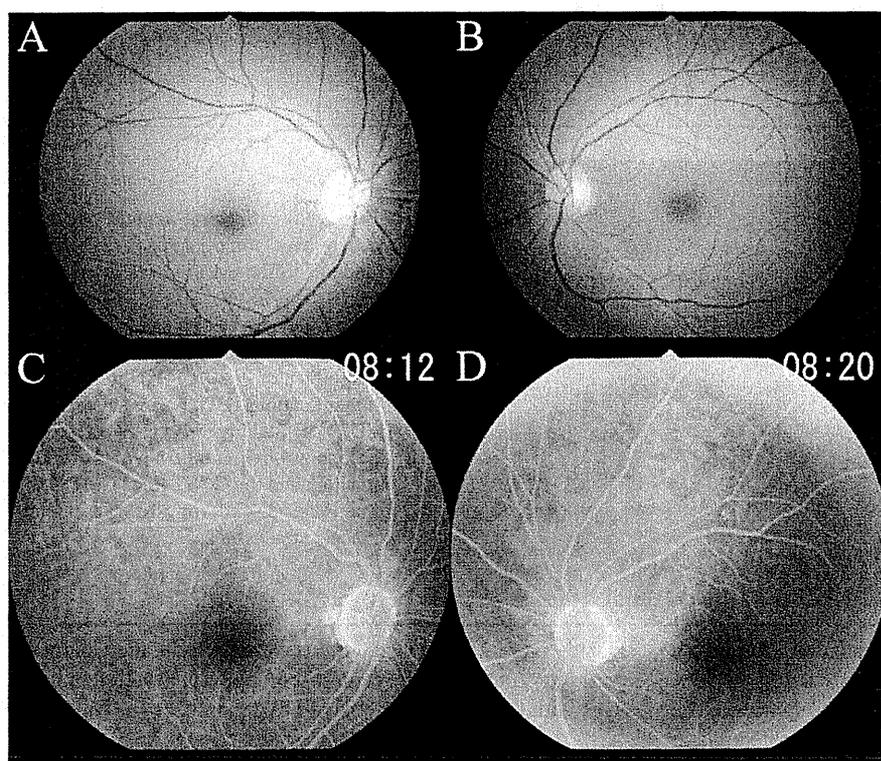


Figure 1. Fundus photographs (A, B) and fluorescein angiograms (C, D) of this case showing no abnormal findings.

considerations. SIFT generates multiple alignments of the sequence over different species to look at the conserved sequences of a gene; it assesses the conserved amino acid positions and analyzes the effect of missense changes on the conserved structure of proteins over the course of evolution. The SIFT tool assigns a score to the mutations, and a score of <math><0.05</math> is considered potentially damaging. PMut is software aimed at annotating and predicting pathological mutations. Align GVGD combines the biophysical characteristics of

amino acids and protein multiple sequence alignments to predict where missense substitutions in genes of interest fall in a spectrum from enriched deleterious to enriched neutral. MutationTaster evaluates the disease-causing potential of sequence alterations.

Statistical analysis: We calculated the 95% confidence intervals (CI) of the results of the focal macular ERGs of normal controls. There were 25 men and 21 women whose age ranged from 23 to 60 years (mean, 38.04 ± 8.33 years) in

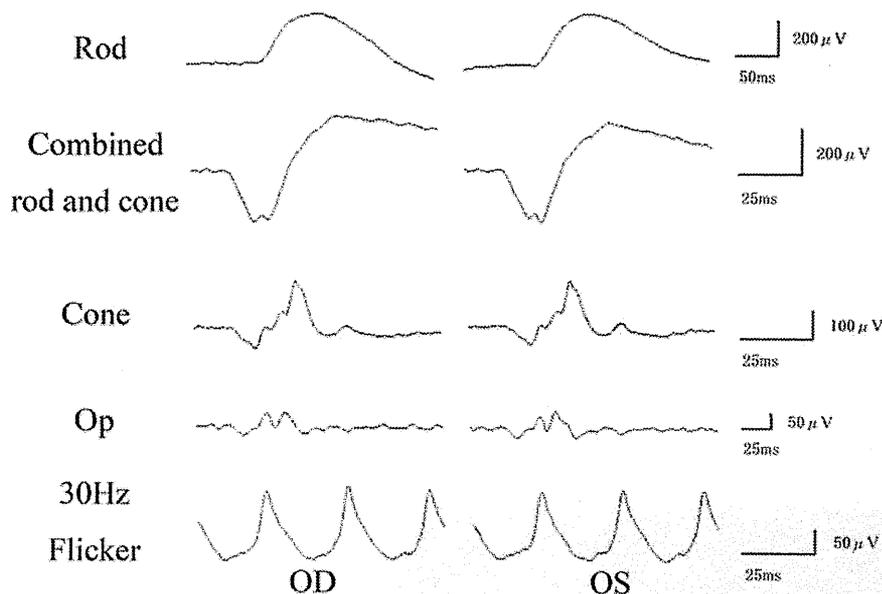


Figure 2. Full-field electroretinograms (ERGs) recorded according to the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) standards protocol in this case. The rod, combined rod-cone, cone, oscillatory potentials, and 30-Hz flicker full-field ERGs are shown. The results of full-field ERGs are within the normal limits in this case.

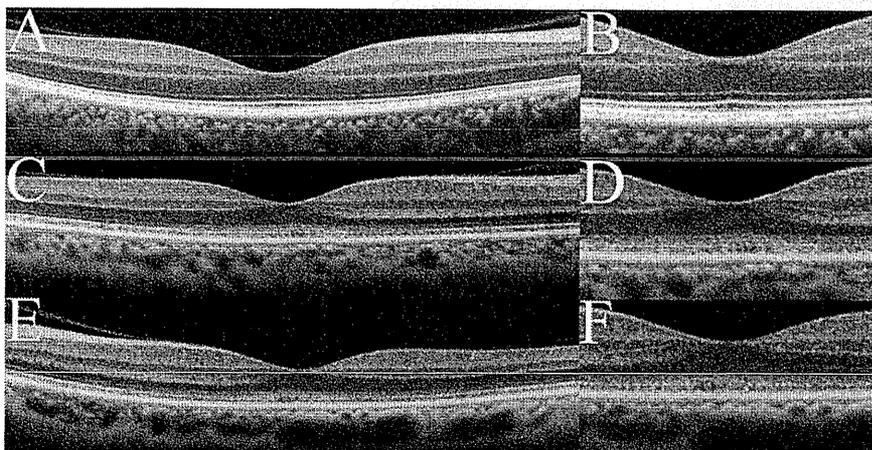


Figure 3. Spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) findings of the eyes in normal controls (A, B) and in this case (C-F). Images from right eyes (C, D) and left eyes (E, F) are shown. Images at lower magnification (A, C, E) and higher magnification (B, D, F) are shown. The SD-OCT findings for the eyes in this case show obvious blurring of the IS/OS junction and the COST line. The COST line disappeared in the peripheral macula area in this case.

this control group. We recorded focal macular ERGs from either of the eyes of normal controls and calculated the 95% CI of the amplitudes of the a-waves and the b-waves, the implicit time of the a-waves and b-waves, the potentials at 70 ms after the stimulus was turned on, and the time of the recovery of the b-wave to the baseline.

RESULTS

Case report: A 52-year-old woman complained of a gradual decrease in vision in both eyes during the past two to three years. Family history revealed no other members with any eye diseases, including her parents who were deceased. Her BCVAs were 20/63 in the right eye and 20/50 in the left eye. The fundus examination, fluorescein angiography, and full-field ERG results were within the normal limits (Figure 1A-

D and Figure 2). The visual fields were full with the Goldmann perimetry, but a relative central scotoma was detected in both eyes with the Humphrey Visual Field Analyzer.

Spectral domain optical coherence tomography: The SD-OCT images of this case showed a blurred IS/OS junction and COST line at the foveal center (Figure 3D,F). In the peripheral macula area, the COST line was absent, and only the blurred IS/OS junction was visible in this case (Figure 3C,E).

Focal macular electroretinograms and multifocal electroretinograms: A severe reduction in the a-waves of the focal macular ERGs was found in this case (Figure 4). Although the b-waves were large, their shapes were abnormal. The b-waves rose to a peak, and the potential was maintained longer than normal. The plateau region of the b-wave was significantly elevated above the baseline potential (Figure 4,

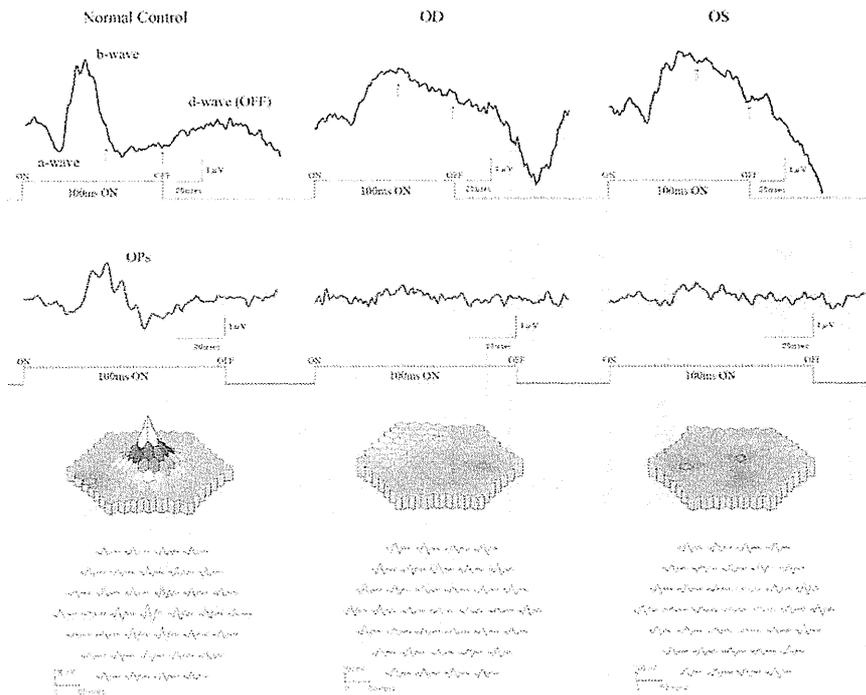


Figure 4. Results of focal macular electroretinograms (ERGs) and multifocal ERGs. Focal macular ERGs and oscillatory potentials recorded from a normal subject and this case are shown (top). The amplitude of the a-wave of this case was severely reduced, and the plateau region was significantly elevated (arrows). The topographic map and the local responses of multifocal ERGs recorded from the normal subject and this case are shown (bottom). The amplitudes in the foveal area were severely reduced in this case.

arrow). To analyze this characteristic, we quantified the potentials at 70 ms after the stimulus was turned on, and the recovery time of the descending slope of b-wave to the baseline from the peak of the b-wave. We calculated the 95% confidence intervals (CI) for the amplitudes of the a-waves and b-waves, the implicit times of the a-waves and b-waves, the potentials at 70 ms after the stimulus turns on, and the time of the recovery of the b-waves to the baseline obtained from the normal controls (Figure 5). Among these six parameters, the amplitudes of the a-waves, the implicit times of the b-waves, the potentials at 70 ms after the stimulus was turned on, and the time of the recovery of the descending slope of the b-wave to the baseline obtained from both eyes of this case were outside the range of the standard deviation and the 95% CI of the normal controls (Figure 5). Especially, the amplitudes of the a-waves, the potentials at 70 ms after the stimulus was turned on, and the time of the recovery of the descending slope of the b-wave to the baseline obtained from this case were severely affected. The amplitudes of the mfERGs in the foveal area were severely reduced in this case (Figure 4).

Molecular genetic findings: Mutation analysis of the *RP1L1* gene in this case showed three missense mutations. There was a c.2578 C>T in exon 4 with a substitution of tryptophan (TGG) for arginine (CGG) at amino acid position 860, a c.3596 C>G in exon 4 with a substitution of cysteine (TGT) for serine (TCT) at amino acid position 1199, and a c.4484 C>G

in exon 4 with a substitution of arginine (CGC) for proline (CCC) at amino acid position 1495. The amino acid substitution at position 860 and 1495 has already been reported in the SNP database and is found in a high percentage of the normal population. A mutation at amino acid position 1199 has not been reported in the SNP database or in earlier reports (Figure 6A). The serine at position 1199 is well conserved among the *RP1L1* family in other species (Figure 6B). This mutation was predicted to be probably damaging with a score of 0.999 by PolyPhen-2. The SIFT tool analysis revealed a score of 0 and predicted that the replaced amino acid is potentially damaging and would not be tolerated. PMut predicted that this mutation is pathological. Align GVGd predicted this mutation as class C65, which means it most likely interferes with the protein function. Out of five computational assessments, only MutationTaster predicted this mutation as a polymorphism. We confirmed that the mutation in this case was segregated with the disease in one affected member and one unaffected member of the family (Figure 6C). The unaffected member of the family in Case 1 underwent clinical examination, including BCVAs, slit-lamp biomicroscopy, fundus ophthalmoscopy, OCT, and focal ERGs. All examination findings were normal. This mutation was not present in 300 control alleles. This mutation p.S1199C has been registered in GenBank with accession number AB684329.

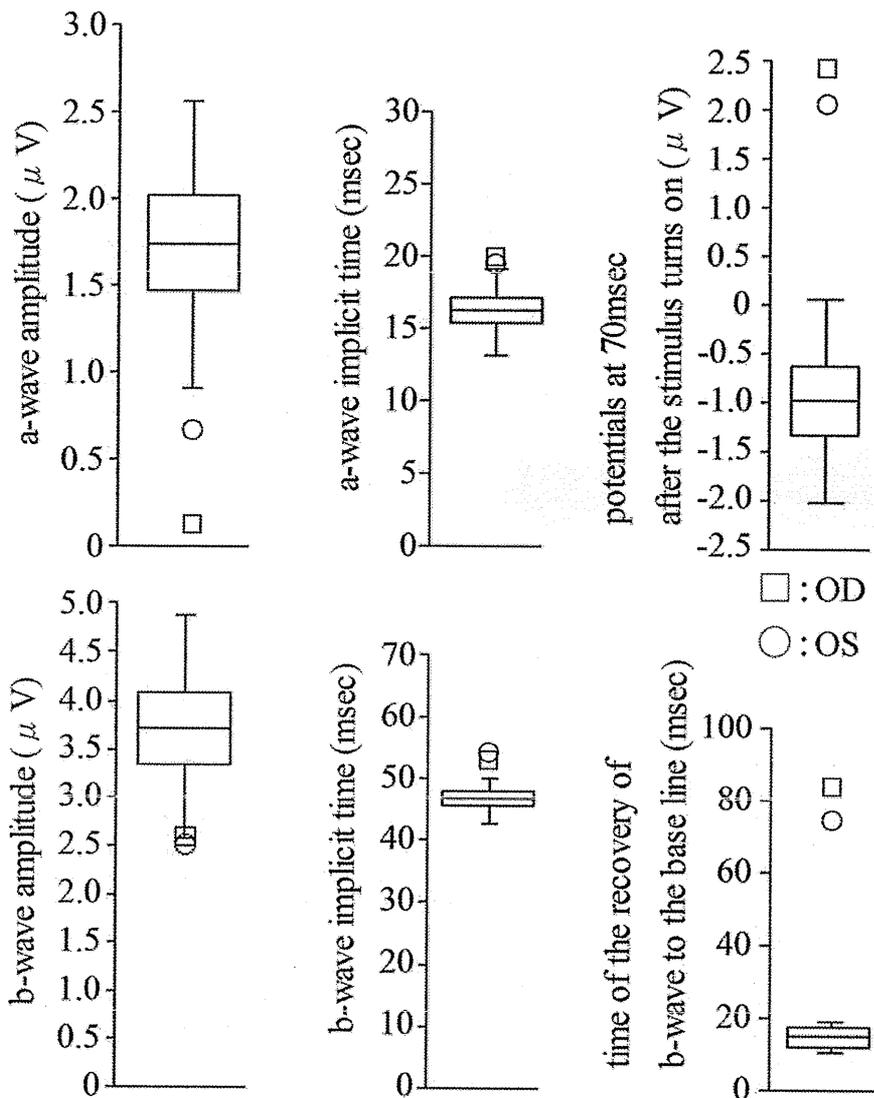


Figure 5. Plot of the amplitudes of the a-waves, b-waves, and the implicit time of the a-waves, b-waves, the potentials at 70ms after the stimulus turns on, and the time of the recovery of b-wave to the baseline for normal controls. There were 25 men and 21 women whose age ranged from 23 to 60 years (mean, 38.04±8.33 years) in this control group. The boxes represent the 95% confidence interval ranges, the horizontal line represents mean values, and the bars represent standard deviation. Data recorded from this case are plotted at indicated mark.

Bowne et al. [11] reported that *RP1L1* mRNA is variable due to the presence of a 48 bp polymorphic coding repeat. They reported that as many as six 48 bp repeats have been observed in normal controls. In this case, one allele contains a 48 bp repeat, and the other allele contains three 48 bp repeats (Figure 6D). There are variations of only two amino acids in the length polymorphism region from this case compared to the reference sequence (NP_849188). One variation with the substitution of E to G in the 14th amino acid of the length polymorphism region was in a previous report [12] (AAN86962, AAN86963, and AAN86964). The other variation with the substitution of G to V in the ninth amino acid of the length polymorphism region was found in more than 10 normal control alleles from a Japanese population. These variations of the length polymorphisms of *RP1L1* with

one and three repeats have been registered in GenBank with accession numbers AB684331 and AB684332, respectively.

DISCUSSION

The mutation found in the *RP1L1* gene in this case was a missense mutation with cysteine substituted for serine at amino acid position 1199. This residue is well conserved among the *RP1L1* family in other species, suggesting the importance of this amino acid residue for *RP1L1* function. Four out of five computational analysis tools predicted this mutation is damaging to the protein function. We did not find this mutation in the sister of the patient with normal vision, although she was the only other family member we were able to test. To decide whether this mutation was pathogenic, we need to examine more family members and a larger number

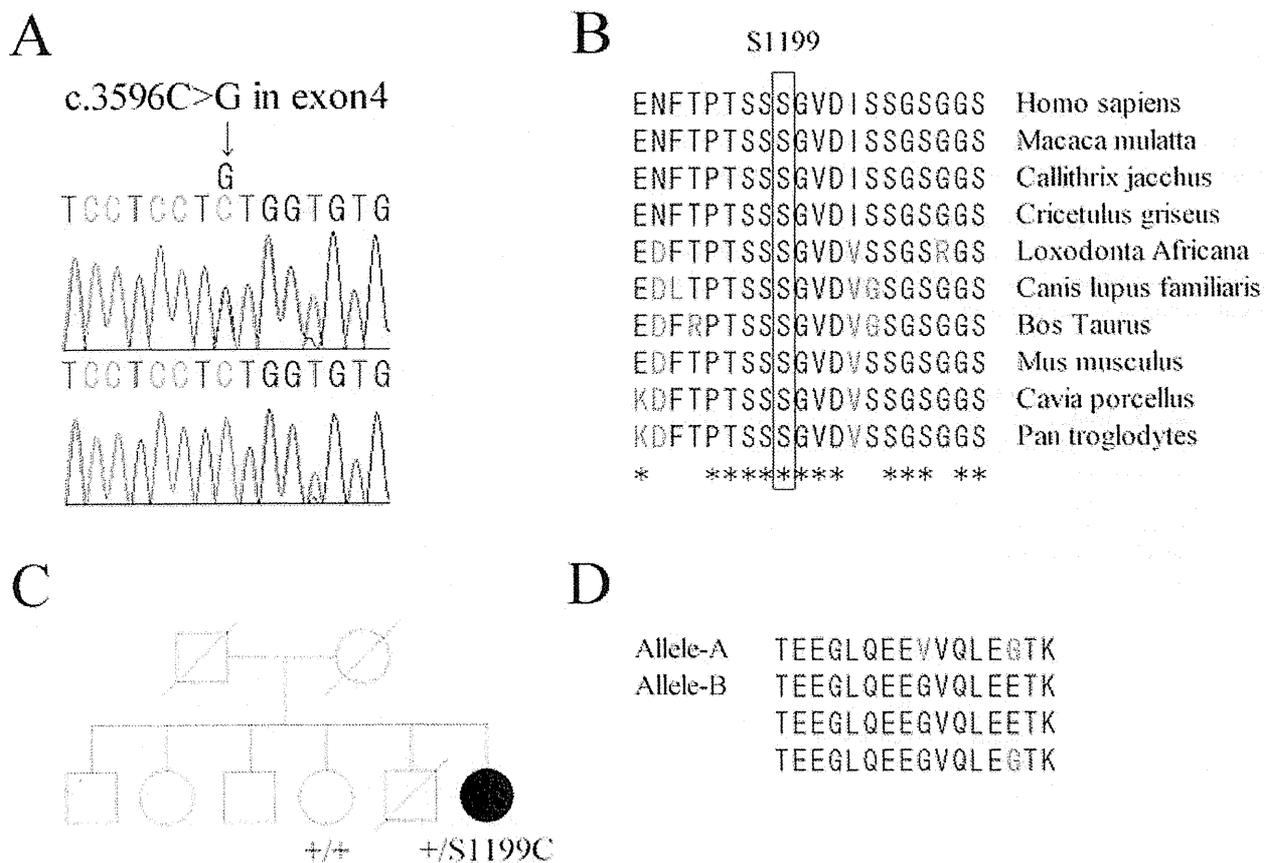


Figure 6. DNA analysis for c.3596C>G mutation and deduced amino acids of length polymorphism region of the RP1-like protein 1 (*RP1L1*) gene and the pedigree of the family with *RP1L1* gene mutation. **A:** Sequence chromatograms for this case (top) and the normal control (bottom) are shown. This case had a c.3596 C>G mutation in exon 4. **B:** Alignment of S1199 in the *RP1L1* family proteins. Amino acid-sequence alignments of *RP1L1* from 10 species reported in the NCBI database are shown. Amino acid residues of S1199 in humans and conserved residues from other species are boxed. The asterisks indicate completely conserved residues. S1199 is well conserved in all species reported. **C:** We confirmed that the mutation in Case 1 was segregated with the disease in one affected member and one unaffected member of the family. **D:** Deduced amino acids (AA) of repeated regions of the *RP1L1* length polymorphism. In this case, one allele contains a 16 AA, and the other allele contains three 16 AA repeats. Variations of amino acids from reference sequence of *RP1L1* are shown in red. Those variations are within normal limits.

of normal controls. However, the phenotype of this case was typical of OMD, and thus the mutation in this case was most likely pathogenic.

The photoreceptor IS/OS junction and the COST line can be detected in the SD-OCT images of normal eyes [25-28]. Recently, several degrees of disruption of the IS/OS junction and/or COST line in the SD-OCT images of patients with OMD have been reported [4-8]. In our case, the IS/OS junction and the COST line appeared blurred in the SD-OCT images similar to previous reports.

Researchers have emphasized that the key to differentiating OMD from other diseases, such as optic neuritis or psychological disorders, is the recording of focal macular ERGs from the central retina [1-3]. Focal macular ERGs have a unique waveform when elicited by long-duration

stimuli [29]. As shown in this patient, the waveform of focal macular ERGs recorded from patients with OMD with long-duration stimuli had a depolarizing pattern, simulating the ERG waveforms observed after the hyperpolarizing bipolar cell activity is blocked [30-33]. Researchers have demonstrated that by blocking hyperpolarizing bipolar cells with cis-2,3-piperidine dicarboxylic acid or kynurenic acid in monkeys, the a- and d-waves of photopic ERGs become smaller and the plateau between the b- and d-waves remains elevated above the baseline potential [34]. Full-field cone ERG in some human retinal dystrophies show a similar depolarizing pattern [29,35]. Kondo et al. [29] reported similar focal macular ERGs elicited with 100 ms stimuli from a patient with glittering crystalline deposits in the posterior fundus. The waveform of the focal macular ERGs of this case

was similar to those reported for patients with OMD [31-33]. Because this case had a putative disease-causing mutation of the *RPIL1* gene, we suggest the reduced amplitude of the a-wave and the persistent plateau between the b- and d-waves of the focal macular ERGs elicited with long-duration stimuli might be specific markers that could help diagnose OMD.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Duco Hamasaki (Bascom Palmer Eye Institute, University of Miami School of Medicine, Miami, FL) for proofreading of our manuscript.

REFERENCES

- Miyake Y, Ichikawa K, Shiose Y, Kawase Y. Hereditary macular dystrophy without visible fundus abnormality. *Am J Ophthalmol* 1989; 108:292-9. [PMID: 2774037]
- Miyake Y, Horiguchi M, Tomita N, Kondo M, Tanikawa A, Takahashi H, Suzuki S, Terasaki H. Occult macular dystrophy. *Am J Ophthalmol* 1996; 122:644-53. [PMID: 8909203]
- Mathews GP, Sandberg MA, Berson EL. Foveal cone electroretinograms in patients with central visual loss of unexplained etiology. *Arch Ophthalmol* 1992; 110:1568-70. [PMID: 1444913]
- Park SJ, Woo SJ, Park KH, Hwang JM, Chung H. Morphologic photoreceptor abnormality in occult macular dystrophy on spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:3673-9. [PMID: 20164460]
- Sisk RA, Berrocal AM, Lam BL. Loss of Foveal Cone Photoreceptor Outer Segments in Occult Macular Dystrophy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2010; 9:1-3. [PMID: 20337322]
- Kim YG, Baek SH, Moon SW, Lee HK, Kim US. Analysis of spectral domain optical coherence tomography findings in occult macular dystrophy. *Acta Ophthalmol* 2011; 89:e52-6. [PMID: 20560888]
- Fujinami K, Tsunoda K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Miyake Y. Fundus autofluorescence in autosomal dominant occult macular dystrophy. *Arch Ophthalmol* 2011; 129:597-602. [PMID: 21555613]
- Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. Clinical characteristics of occult macular dystrophy in family with mutation of *RPIL1* gene. *Retina*. 2012 [PMID: 22466457] In press
- Lyons JS. Non-familial occult macular dystrophy. *Doc Ophthalmol* 2005; 111:49-56. [PMID: 16502307]
- Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Usui T, Hatase T, Nakamura M, Ohde H, Itabashi T, Okamoto H, Takada Y, Iwata T. Dominant mutations in *RPIL1* are responsible for occult macular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2010; 87:424-9. [PMID: 20826268]
- Conte I, Lestingi M, den Hollander A, Alfano G, Ziviello C, Pugliese M, Circolo D, Caccioppoli C, Ciccociola A, Banfi S. Identification and characterization of the retinitis pigmentosa 1-like1 gene (*RPIL1*): a novel candidate for retinal degenerations. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:155-62. [PMID: 12634863]
- Bowne SJ, Daiger SP, Malone KA, Heckenlively JR, Kennan A, Humphries P, Hughbanks-Wheaton D, Birch DG, Liu Q, Pierce EA. Characterization of *RPIL1*, a highly polymorphic paralog of the retinitis pigmentosa 1 (*RP1*) gene. *Mol Vis* 2003; 9:129-37. [PMID: 12724644]
- Yamashita T, Liu J, Gao J, LeNoue S, Wang C, Kaminoh J, Bowne SJ, Sullivan LS, Daiger SP, Zhang K. Essential and synergistic roles of *RP1* and *RPIL1* in rod photoreceptor axoneme and retinitis pigmentosa. *J Neurosci* 2009; 29:9748-60. [PMID: 19657028]
- Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M, International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol* 2009; 118:69-77. [PMID: 19030905]
- Miyake Y, Shiroyama N, Horiguchi M, Ota I. Asymmetry of focal ERG in human macular region. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30:1743-9. [PMID: 2759790]
- Miyake Y. Macular oscillatory potentials in humans: macular OPs. *Doc Ophthalmol* 1990; 75:111-24. [PMID: 2276312]
- Miyake Y. Focal macular electroretinography. *Nagoya J Med Sci* 1998; 61:79-84. [PMID: 9879190]
- Bearse MA Jr, Sutter EE. Imaging localized retinal dysfunction with the multifocal electroretinogram. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 1996; 13:634-40. [PMID: 8627420]
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; 7:248-9. [PMID: 20354512]
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3812-4. [PMID: 12824425]
- Ferrer-Costa C, Orozco M, de la Cruz X. Characterization of disease-associated single amino acid polymorphisms in terms of sequence and structure properties. *J Mol Biol* 2002; 315:771-86. [PMID: 11812146]
- Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, de Silva D, Zharkikh A, Thomas A. Comprehensive statistical study of 452 *BRCA1* missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet* 2006; 43:295-305. [PMID: 16014699]
- Mathe E, Olivier M, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Tavtigian SV. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:1317-25. [PMID: 16522644]
- Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010; 7:575-6. [PMID: 20676075]
- Srinivasan VJ, Monson BK, Wojtkowski M, Bilonick RA, Gorczynska I, Chen R, Duker JS, Schuman JS, Fujimoto JG. Characterization of outer retinal morphology with high-speed, ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:1571-9. [PMID: 18385077]
- Marmor MF, Choi SS, Zawadzki RJ, Werner JS. Visual insignificance of the foveal pit: reassessment of foveal

- hypoplasia as fovea plana. Arch Ophthalmol 2008; 126:907-13. [PMID: 18625935]
27. Byeon SH, Kang SY. Interpretation of outer retina appearance in high-resolution optical coherence tomography. Am J Ophthalmol 2009; 147:185-6. [PMID: 19100358]
 28. Lim JI, Tan O, Fawzi AA, Hopkins JJ, Gil-Flamer JH, Huang D. A pilot study of Fourier-domain optical coherence tomography of retinal dystrophy patients. Am J Ophthalmol 2008; 146:417-26. [PMID: 18635153]
 29. Kondo M, Miyake Y. Assessment of local cone on- and off-pathway function using multifocal ERG technique. Doc Ophthalmol 2000; 100:139-54. [PMID: 11142743]
 30. Miyake Y. What can we know from focal macular ERG? Jpn J Clin Ophthalmol. 2002; 56:680-8.
 31. Okuno T, Oku H, Kondo M, Miyake Y, Sugawara J, Utsumi T, Ikeda T. Abnormalities of visual-evoked potentials and pupillary light reflexes in a family with autosomal dominant occult macular dystrophy. Clin Experiment Ophthalmol 2007; 35:781-3. [PMID: 17997791]
 32. Hanazono G, Ohde H, Shinoda K, Tsunoda K, Tsubota K, Miyake Y. Pattern-reversal visual-evoked potential in patients with occult macular dystrophy. Clin Ophthalmol. 2010; 4:1515-20. [PMID: 21191449]
 33. Miyake Y. Occult macular dystrophy. Electrodiagnosis of retinal diseases. Tokyo, Japan: springer-Verlag; 2006:153-159
 34. Sieving PA, Murayama K, Naarendorp F. Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. Vis Neurosci 1994; 11:519-32. [PMID: 8038126]
 35. Sieving PA. 'Unilateral cone dystrophy': ERG changes implicate abnormal signaling by hyperpolarizing bipolar and/or horizontal cells. Trans Am Ophthalmol Soc 1994; 92:459-71. [PMID: 7886877]

厚生労働省 障害者対策総合研究事業

緑内障のmultiple rare variantsの発見と病態機序の解明による
予防・治療法の開発

(H22-感覚一般-002)

平成 23 年度 総括研究報告書

岩田 岳

平成 24 年 5 月