

Table 2. (Continued)

Case	Age and Gender	BCVA at Final Visit		Refraction (D)*		Visual Field	Fundus Appearance	FA	Full-Field ERG	Relative Amplitude in mfERG at Fovea (Ring 1/Ring 5 or Ring 6)†	Other Ocular Disorders
		OD	OS	OD	OS						
9	66, M	0.2	0.3	+0.125	+0.125	Relative central scotoma, OU	Normal, OD Background diabetic retinopathy with microaneurysm, OS	Normal, OU	Normal mixed rod-cone responses, OU	1.21, OD1.59, OS	Senile cataract, OU
10	58, F	0.1	0.1	+0.5	+0.375	Relative central scotoma, OU	Normal, OU	NE	Normal cone responses, OU	Not measurable, OU	—
11	57, F	0.1	0.4	+0.5	0.0	Relative central scotoma, OU	Normal, OU	Normal, OU	Normal ISCEV standard protocol ERG, OU	Not measurable, OU	—
12	20, M	0.3	0.3	-0.375	-0.75	Relative central scotoma, OU	Normal, OU	Normal, OU	Normal ISCEV standard protocol ERG, OU	0.98, OD1.03, OS	—
13	18, F	0.2	0.15	-1.625‡	-2.75‡	Relative central scotoma, OU	Normal, OU	Normal, OU	Normal ISCEV standard protocol ERG, OU	Not measurable, OU	—
14	28, M	1.0	0.6	-0.25	-0.25	Relative central scotoma, OU	Normal, OU	NE	Normal ISCEV standard protocol ERG, OU	1.63, OD, 0.66, OS	—

D, diopter; ISCEV, International Society of Clinical Electrophysiology and Vision; NE, not examined.

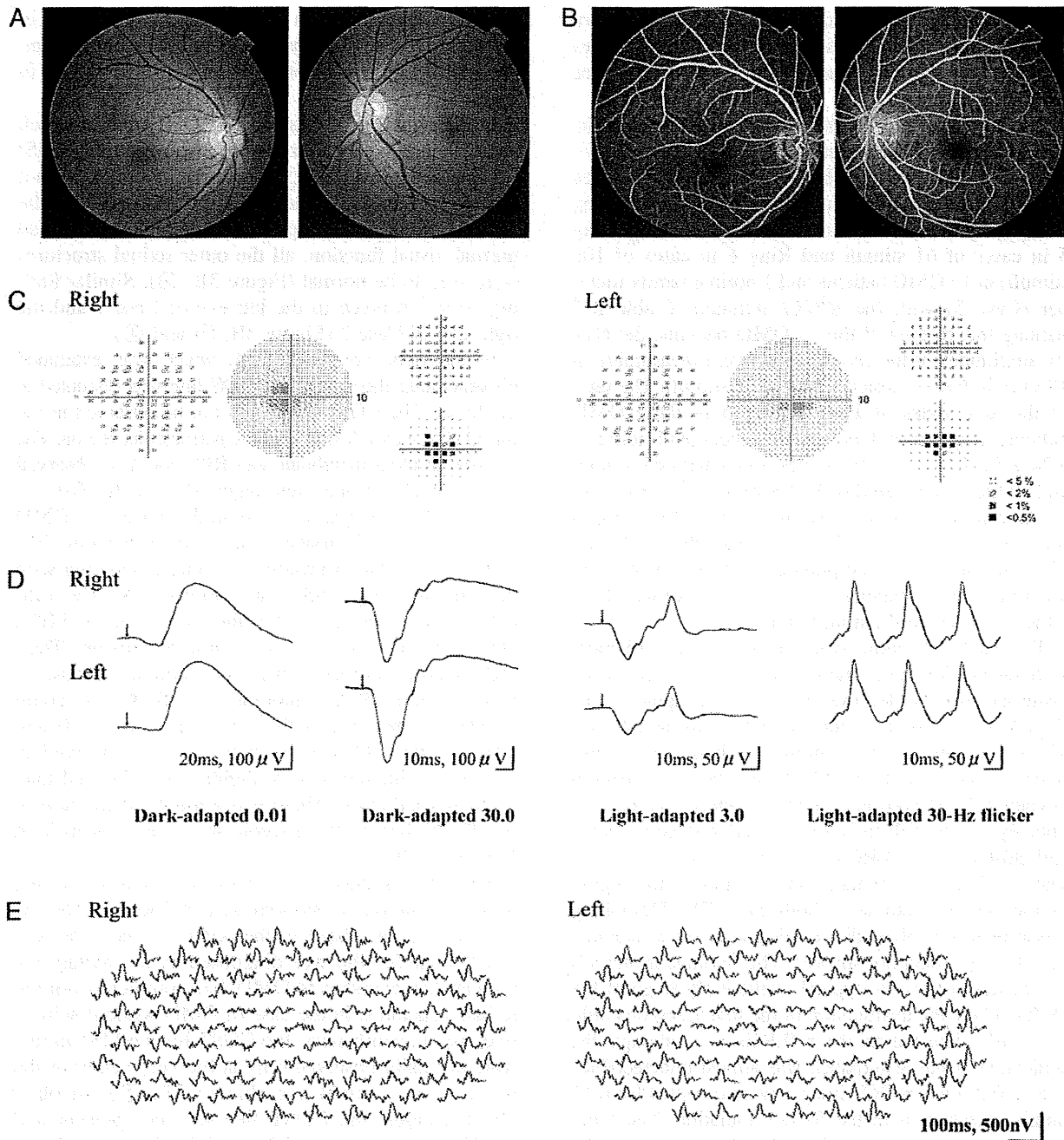
\*Spherical equivalents at the initial visit.

†The responses of Ring 1 were extinguished and the N1-P1 amplitudes were not measurable in Cases 2, 3, 4, 7, 10, 11, and 13.

‡This patient had already undergone cataract surgeries for both eyes at the initial visit, and no data could be obtained about the original refraction.

§This patient's visual acuity was reduced also by senile cataract.

¶The refraction of this patient was measured after instillation of cycloplegics.



**Fig. 2.** Results of ocular examination of Patient 11. The data in (A) to (E) were collected 3 years after the onset of the visual disturbance at age 50 years. At this time, the patient had not noticed a decrease in the visual acuity in her left eye. The BCVA was 0.1 in the right eye and 1.2 in the right eye. A, and B. Fundus photographs and FAs showing no abnormal findings. C. Static visual field test (Humphrey Visual Field Analyzer, 10-2) showing relative central scotoma in both eyes. D. Full-field rod, mixed rod-cone, cone ERGs, and 30-Hz flicker responses. All the responses are normal in both eyes. E. Trace arrays of mfERGs tested with 103 hexagonal stimuli shown without spatial averaging. The responses of the central locus are extinguished in both eyes.

after the onset. This patient first noticed visual disturbances at age 20 years and was diagnosed with OMD at age 73 years. The appearance of the macula and optic disk at age 83 years was still normal >60 years after the onset of the symptoms.

Rod, mixed rod-cone, and cone full-field ERGs were recorded from 7 patients using the International Society of Clinical Electrophysiology and Vision standard protocol, and all of them showed normal rod and cone responses as in the representative case shown in

Figure 2. Only the mixed rod–cone responses were recorded from Patient 9, and only the cone responses were recorded from Patient 10, and these responses were also normal.

The amplitudes of the mfERGs were reduced in the central region of both eyes in all the 13 patients. We quantified the relative mfERG responses at the fovea by dividing the N1–P1 amplitudes of the central ring (Ring 1) by those in the outermost eccentric ring (Ring 5 in cases of 61 stimuli and Ring 6 in cases of 103 stimuli) in 13 OMD patients and 1 normal family member (Case 5) with the *RP1L1* mutation (Table 2).<sup>4</sup> Among the 26 eyes of the 13 OMD patients, the N1–P1 amplitudes of the central locus were measurable in 12 eyes in 6 cases tested with the 61 stimuli. The ratio of the amplitudes of Ring 1/Ring 5 in these OMD patients ranged from 0.60 to 2.74 (average of normals:  $4.34 \pm 0.67$ ,  $n = 20$ ). In 6 eyes tested with 61 stimuli and all the 8 eyes tested with 103 stimuli, the responses in the central locus were extinguished and the amplitudes were not measurable (see examples in Figure 2E). The ratio of the amplitudes of Ring 1/Ring 5 in a normal family member (Case 5, right eye) was 4.24, which was within the normal range.

The results of routine ocular examinations in Patient 11 at the age 50 years, when she did not have any visual disturbances in her left eye, are shown in Figure 2. The BCVA was 0.1 in the right eye and 1.2 in the left eye. The fundus and FA were normal in both eyes. Humphrey visual field tests (SITA Standard and pattern deviation 10-2) showed a relative central scotoma in both eyes. The full-field rod, mixed rod–cone, cone, and 30-Hz flicker ERGs were normal in both eyes. The mfERGs were reduced in and around the region of the central scotoma in both eyes. The Humphrey visual field test (30-2) did not detect a central scotoma in either eye (data not shown). The findings in the left eye of this patient are typical of the early stage of the OMD, where the dysfunction of the foveal region could be clearly detected in the mfERGs even though the subjective visual disturbance was almost undetectable.

Spectral-domain OCT images were recorded from 11 family members with the *RP1L1* mutation. The outer retinal structure was considered to be normal when the external limiting membrane, photoreceptor inner/outer segment (IS/OS) line, cone outer segment tip (COST) line, and retinal pigment epithelium (RPE) were clearly detected in the OCT images (Figure 3A).<sup>11,23</sup>

The OCT images of 5 representative OMD patients are aligned in the order of years after the onset in Figure 3B. The right eye of Case 1, which had electrophysiologically confirmed macular dysfunction but did not have subjective visual disturbances, showed a normal IS/OS line and COST line but only at the

foveal center (asterisk in Figure 3B, ①). However, in the parafoveal region, the IS/OS line was blurred and the COST line could not be observed (arrowheads in Figure 3B, ①).

In the right eye of Case 11, the OCT images which were taken 10 years after the onset showed that the IS/OS line at the fovea was very blurred and thick but not disrupted. The COST line could not be observed in the macular area. In the perimacular region that had normal visual function, all the outer retinal structures were seen to be normal (Figure 3B, ②). Similar findings were observed in the left eye of Case 1 and the right eye of Case 8 (Figure 3B, ③ and ④).

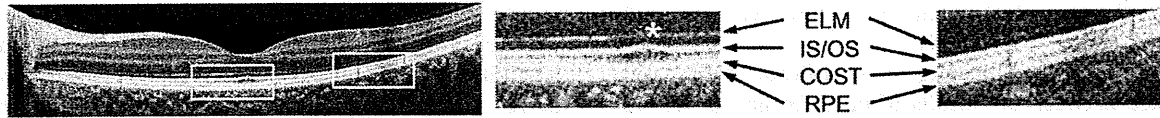
In the right eye of Case 4, which was examined 63 years after the onset, the IS/OS line was disrupted at the fovea. The COST line could not be observed in the macula but was still visible in the perimacular region. The external limiting membrane and RPE could be observed to be normal over the entire region (Figure 3B, ⑤).

The OCT images of 2 sporadic cases of OMD without the *RP1L1* mutation are shown in Figure 3C. Both patients had a progressive central scotoma with normal-appearing fundus and normal FA. The full-field ERGs were normal but the focal macular ERGs elicited with a 10° spot were not recordable. Their OCT images, however, were not similar to those in patients with *RP1L1* mutation; the IS/OS line could be clearly observed at the fovea (Figure 3C, ① and ②), and the COST line could also be observed at the fovea, although it was slightly more blurred than in the normal cases. There was a minute disruption of the IS/OS line at the foveola in 1 case (asterisk in Figure 3C, ①).

The OCT findings in 21 eyes of 11 cases with the *RP1L1* mutation are summarized in Table 3. The examined eyes are listed in the order of years after the onset. Case 5, who was diagnosed as not having the typical characteristics of OMD, had completely normal retinal structures. In the case of OMD without subjective visual disturbances, the COST line and IS/OS line were normally observed only at the very center of the fovea (Case 1, right eye, Figure 3B, ①). In other affected cases, the COST line was not present and the IS/OS line appeared blurred in the entire fovea (Cases 14, right eye to 8). In patients with longer duration OMD, the IS/OS line was disrupted or not present as in Cases 2 and 4.

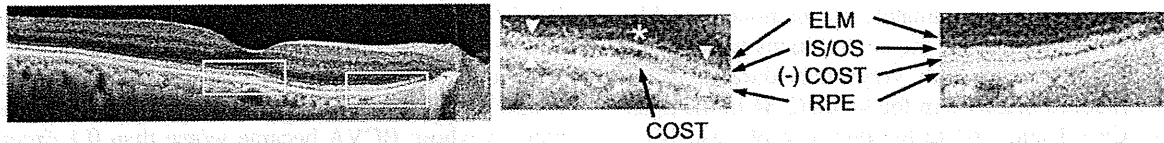
The retinal thickness at the foveola was measured as the distance from the internal limiting membrane to the inner border of the RPE. Considering the variation in the thickness in normals, we classified that the retina at the foveola was abnormally thin when the thickness was  $<160 \mu\text{m}$ . All the affected eyes with disease duration  $\leq 12$  years had normal foveal thickness (right

**A** Normal, *RP1L1* mutation (-) (22 y/o woman, OS)

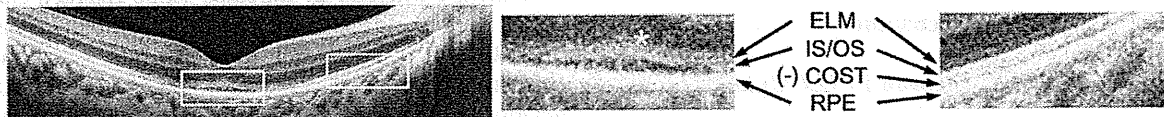


**B** OMD, *RP1L1* mutation (+)

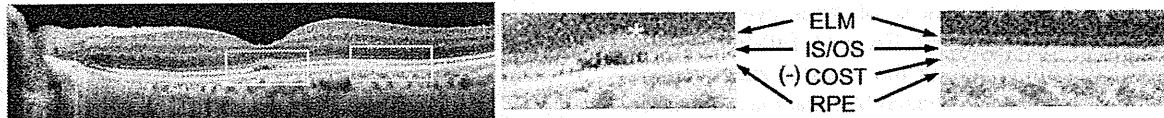
① No subjective visual disturbance (Case 1, OD)



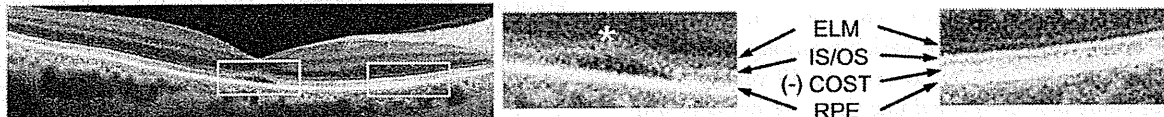
② 10 yrs after the onset (Case 11, OD)



③ 26 yrs after the onset (Case 1, OS)



④ 41 yrs after the onset (Case 8, OD)



⑤ 63 yrs after the onset (Case 4, OD)



**C** OMD, Sporadic, *RP1L1* mutation (-)

① 66-year-old female patient



② 55-year-old male patient



**Fig. 3.** Optical coherence tomography images horizontally profiled along the foveola (left) and magnified images in the fovea and the perimacular region (right). Outer retinal structures, such as external limiting membrane (ELM), photoreceptor IS/OS line, COST line, and RPE, are indicated by arrows. The foveal center is indicated by an asterisk. All the OCT images were taken with the HD-OCT (Carl Zeiss). **A.** Optical coherence tomography image of a normal control without the *RP1L1* mutation (22-year-old woman). All the outer retinal structures, for example, external limiting membrane, IS/OS line, COST line, and RPE, are clearly observed both in the fovea and the perimacular region. **B.** Optical coherence tomography images of patients affected by OMD with the *RP1L1* mutation. ①. Optical coherence tomography image of the right eye of Case 1, which did not have subjective visual disturbances. The COST line is present in the foveal center (black arrow), but not in the parafoveal region (arrowheads). The IS/OS line is clearly

eye of Cases 1 to Case 13), whereas the fovea of all the affected eyes with durations  $\geq 20$  years were classified as thin (Case 7 to Case 4).

To determine whether a significant correlation existed between the results of mfERGs and OCT, the relative amplitudes of the mfERGs at the fovea (Ring 1/Ring 5 or 6) are listed in Table 3. In cases where the disease durations was  $\geq 3$  years, the relative amplitude at the fovea was approximately 1.0 or nonrecordable because the responses of the central locus were extinguished. Only cases with very short durations had mildly reduced mfERGs in the fovea (2.34 in the right eye of Case 1 and 1.63 in the right eye of Case 14).

### Discussion

#### Course of OMD Patients with *RP1L1* Mutation

Our results confirmed that all the patients with the *RP1L1* mutation had similar phenotypes; slowly progressive visual disturbances of both eyes, normal-appearing fundus, normal FA and full-field ERGs during the entire course of the disease, selective dysfunction at the macula detected by focal macular ERGs and mfERGs, selective abnormality of the photoreceptor layer in the macula revealed by OCT, and a final BCVA not poorer than 0.1. The age at the onset of OMD was, however, very variable among the family members and varied from 6 years to 50 years.

Our study also confirmed that there are patients with OMD who have normal visual acuity and no subjective visual disturbances until the disease progressed to a more advanced stage. Similar findings have been reported for other patients with OMD,<sup>1,2,24</sup> although the etiology of these patients was not confirmed by genetic analyses. For such patients, the function of the small region in the foveola of these eyes has probably been spared so that the BCVA was normal. This was morphologically confirmed by the OCT; in the right eye of Case 1, the BCVA of which was 1.2, the OCT image showed that photoreceptor structures were spared only at the foveal center.

Among the 14 family members with the *RP1L1* mutation, only Case 5 (60-year-old woman) did not

show any signs of macular dysfunction in both subjective and objective tests. Thus, this woman may be a carrier of a mutated gene, but we cannot exclude the possibility that macular dysfunction may appear later. In our genetic study of 4 other OMD families, 2 brothers (58 and 55 years old) were not diagnosed with OMD, although both had the *RP1L1* mutation (p.Arg45Trp).<sup>12</sup> In all the OMD patients with the *RP1L1* mutation, the visual dysfunction was detected no later than 50 years of age.<sup>12</sup>

Occult macular dystrophy has been reported to be a slowly progressive disease; however, there were no patients whose BCVA became worse than 0.1 except for Patient 7 who had an untreated senile cataract. Our results confirmed that once the BCVA is reduced to 0.1 to 0.2, the disease becomes stationary and both the subjective and objective visual functions do not deteriorate thereafter. Similarly, in 3 other families with the *RP1L1* mutation, the final BCVA was not worse than 0.15 in any member.<sup>12</sup>

There was 1 family member (asterisk, Figure 1) who had a sudden decrease of vision in the left eye at age 49 years, but she was diagnosed with retrobulbar neuritis at the Niigata University. Her vision did not recover after steroid pulse therapy, and the optic disk gradually became atrophic. The BCVA 1 year later was 1.2 in the right eye and 0.07 in the left eye. We concluded that the vision reduction was not related to the OMD. Nakamura et al<sup>25</sup> reported a case of OMD that had normal-tension glaucoma with abnormal cupping of the optic disk. To date, the relationship between OMD and optic disk diseases has not been determined. In our family, the optic disks of all the OMD patients appeared normal, and OCT did not show any thinning of the nerve fiber layer or ganglion cell layer in any of the patients.

#### Diagnostic Reliabilities of mfERGs and OCT

There were patients, such as Case 6 (both eyes), Case 1 (right eye), and Case 11 (left eye), with OMD from an *RP1L1* mutation who did not have any subjective visual disturbances and whose diagnosis were only confirmed by the electrophysiologic tests. These

**Figure 3. (continued)** observed at the foveal center (asterisk) but appears blurred in the parafoveal region (arrowheads). ②, ③, and ④. Optical coherence tomography image of the right eye of Case 11, the left eye of Case 1, and the right eye of Case 8, which show typical signs of OMD. The COST line is not present over the entire macula but is present in the perimacular regions. The IS/OS line is blurred and thick in the fovea. ⑤. Optical coherence tomography image (vertical section) of the right eye of Case 4. This image was obtained 63 years after the onset of visual symptoms. The IS/OS line is disrupted at the fovea. The COST line cannot be seen in the macula but is still visible in the perimacular region. There is an apparent thinning of the photoreceptor layer at the fovea. C. Optical coherence tomography images of sporadic cases of OMD without the *RP1L1* mutation. ① and ②. Both patients had progressive central scotoma with normal-appearing fundus and normal FA. The full-field ERGs were normal but focal macular ERGs elicited by a 10° spot were not recordable. The IS/OS line could be clearly observed at the fovea in both cases, except in minute disruption at the foveola in ① (asterisk). The COST line could be observed at the fovea in both cases, although slightly more blurred than in the normal case.

Table 3. Optical Coherence Tomography Findings in 21 Eyes of 11 Family Members with RP1L1 Mutation in the Order of Years After the Onset

Years After the Onset (Years)	Case	OD/OS	BCVA	Relative Amplitude in mfERG at fovea (Ring 1/Ring 5 or 6)	OCT Findings at Fovea				Other Findings
					Disappearance of COST at fovea	Blurring of IS/OS Junction at Fovea	Abnormality of RPE	Thinning of Fovea (Thickness <160 μm)	
None	5	OD	1.2	4.24	-	-	-	-(217)	Not diagnosed as OMD No subjective visual disturbance
Unknown	1	OD	1.2	2.34	±*	±*	-	-(200)	
2	14	OD	1.0	1.63	+	+	-	-(160)	
3	11	OS	0.4	Not measurable	+	+	-	-(168)	
6	12	OD	0.3	0.98	+	+	-	-(174)	
		OS	0.3	1.03	+	+	-	-(168)	
10	14	OS	0.6	0.66	+	+	-	-(160)	
10	11	OD	0.1	Not measurable	+	+	-	-(164)	
12	13	OD	0.2	Not measurable	+	+	-	-(181)	
		OS	0.15	Not measurable	+	+	-	-(177)	
		OD	0.1	Not measurable	+	+	-	+(134)	
20	7	OS	0.07	Not measurable	+	+	-	+(142)	
		OS	0.1	0.60	+	+	-	+(150)	
38	10	OD	0.1	Not measurable	+	+	-	+(150)	
		OS	0.1	Not measurable	+	+	-	+(153)	
41	8	OD	0.1	1.01	+	+	-	+(148)	
		OS	0.1	1.30	+	+	-	+(148)	
46	2	OD	0.4	Not measurable	+	+†	-	+(156)	
		OS	0.5	Not measurable	+	+†	-	+(154)	
63	4	OD	0.2	Not measurable	+	+†	-	+(77)	
		OS	0.2	Not measurable	+	+†	-	+(76)	

\*The COST and IS/OS junction were normal only at the foveal center. In the parafovea, the COST could not be observed and the IS/OS junction was blurred.

†The IS/OS junction was disrupted at the fovea.



findings indicate that mfERGs or focal macular ERGs are sensitive enough to detect very early macular dysfunction in OMD.

Similarly, OCT could be another sensitive tool for the detection of early OMD because an abnormality of the COST line and the IO/OS line in the macula was observed in all the affected cases. However, we believe that the mfERG is more sensitive than OCT in detecting early dysfunctions of the macula in eyes with OMD. For example, Case 14 was a 28-year-old man whose BCVA was 1.0 (right eye) and 0.6 (left eye), but his fundus and visual field tests did not show any differences between the 2 eyes. He did notice a visual disturbance in his left eye 8 years before the onset in his right eye. In the OCT images, both the COST line and the IS/OS line were similarly affected for both eyes at the fovea, and the retinal thickness at the fovea was 160  $\mu\text{m}$  in both eyes (Table 3). The mfERGs, on the other hand, were different in the 2 eyes; the relative amplitude of mfERG at the fovea (Ring 1/Ring 5) was 1.63 (38.2/23.5) in his right eye and 0.66 (15.8/23.8) in his left eye (Table 3). Thus, we believe that both the mfERGs and OCT can be useful in the diagnosis of OMD, but mfERGs are more reliable in detecting and evaluating minimal macular dysfunction at the early stage of the disease. The abnormalities in the OCT, however, progress slowly and continuously until the late stage, and thus they may be more useful for following the long-term progression of OMD.

#### Roles of *RP1L1* Gene and Occurrence of OMD

Our study confirmed that all the affected patients with *RP1L1* mutation had abnormalities of the photoreceptor structures; the IS/OS line was very blurred and thick and the COST line could not be observed in the macula (Figure 2). But in the perimacular region, which had normal visual function, all the outer retinal structures were seen to be normal. During the whole disease process, neither the external limiting membrane nor the RPE had any significant changes and remained normal. In some of sporadic cases of the OMD, similar abnormalities in the OCT could not be observed, although localized macular dysfunction was confirmed electrophysiologically (Figure 3C).

The location of COST line coincided with the location where the outer segment disks are renewed in the cones.<sup>23,26</sup> The disappearance of the COST line indicates an early stage of dysfunction of the cone photoreceptors as has been found in acute zonal occult outer retinopathy.<sup>11</sup> Recently, ultrahigh-resolution OCT with adaptive optics has revealed that the IS/OS line corresponds to the ellipsoids of the photoreceptor inner segments, which are rich in mitochondria and play important roles in cellular metabolism.<sup>27</sup>

Immunohistochemistry for the *RP1L1* gene in retinal section of cynomolgus monkeys showed that it was expressed in both the inner and outer segments of the rod and cone photoreceptors, although the exact site within the photoreceptor has not been confirmed.<sup>12</sup> *RP1L1* is believed to play important roles in the morphogenesis of photoreceptors, and once the function of *RP1L1* is disrupted by a mutation, both the electrophysiologic responses and structures of the photoreceptor can be altered. Cellular dysfunction because of an *RP1L1* mutation affects either the inner or outer segment, or both, of the photoreceptors, which first becomes apparent as an abnormality of both the COST line and IS/OS line in the OCT images.

Considering that the OCT abnormalities in sporadic cases did not show similar pattern as patients with the *RP1L1* mutation, the phenotypically confirmed OMD surely consists of diseases caused by several independent etiologies. In any case, the abnormalities in the mfERGs and OCT observed in OMD in this family strongly support the contribution of *RP1L1* mutation to the presence of this disease.

There are still some important questions of the disease process in OMD that are unsolved. First, why is only the macular region affected while the perimacular region remains intact both functionally and morphologically even at a very advanced stage? Second, why do OMD patients have normal fundus appearance until the end stage, and why does the RPE remain intact until the end stage when the photoreceptor structures are markedly damaged (Figure 3B, ⑤)? Fujinami et al<sup>28</sup> demonstrated that the fundus autofluorescence images in the macula of OMD patients are normal, indicating that the RPE is normal. Third, why does the disease progression stop when the BCVA decreases to 0.1 to 0.2?

These characteristics in the disease process are peculiar to the OMD and not observed in other macular dystrophies. More detailed investigations on the function of *RP1L1* should provide information to answer these questions.

We suggest that OMD is not a single disease caused by a specific gene mutation, *RP1L1*, but may represent different disease entities with similar retinal dysfunctions. Considering all our findings on OMD, we can phenotypically define the OMD as a slowly progressing bilateral dysfunction of the photoreceptors located in the macula, not accompanied by either vascular or RPE damage. The etiology of OMD cases without the *RP1L1* mutation is now under investigation with large number of cases and some of them might be found to be because of other autosomal recessive mutations.

**Key words:** electroretinography, focal macular ERG, multifocal ERG, occult macular dystrophy, optical coherence tomography, *RP1L1*.

### References

- Miyake Y, Ichikawa K, Shiose Y, Kawase Y. Hereditary macular dystrophy without visible fundus abnormality. *Am J Ophthalmol* 1989;108:292-299.
- Miyake Y, Horiguchi M, Tomita N, et al. Occult macular dystrophy. *Am J Ophthalmol* 1996;122:644-653.
- Fujii S, Escano MF, Ishibashi K, et al. Multifocal electroretinography in patients with occult macular dystrophy. *Br J Ophthalmol* 1999;83:879-880.
- Piao CH, Kondo M, Tanikawa A, et al. Multifocal electroretinogram in occult macular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:513-517.
- Wildberger H, Niemyer G, Junghardt A. Multifocal electroretinogram (mfERG) in a family with occult macular dystrophy (OMD). *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2003;220:111-115.
- Kondo M, Ito Y, Ueno S, et al. Foveal thickness in occult macular dystrophy. *Am J Ophthalmol* 2003;135:725-728.
- Brockhurst RJ, Sandberg MA. Optical coherence tomography findings in occult macular dystrophy. *Am J Ophthalmol* 2007;143:516-518.
- Koizumi H, Maguire JJ, Spaide RF. Spectral domain optical coherence tomographic findings of occult macular dystrophy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2009;40:174-176.
- Lubinski W, Goslawski W, Penkala K, et al. A 43-year-old man with reduced visual acuity and normal fundus: occult macular dystrophy—case report. *Doc Ophthalmol* 2008;116:111-118.
- Park SJ, Woo SJ, Park KH, et al. Morphologic photoreceptor abnormality in occult macular dystrophy on spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:3673-3679.
- Tsunoda K, Fujinami K, Miyake Y. Selective abnormality of cone outer segment tip line in acute zonal occult outer retinopathy as observed by Spectral domain optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 2011;129:1099-1101.
- Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, et al. Dominant mutations in *RP1L1* are responsible for occult macular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2010;87:424-429.
- Conte I, Lestingi M, den Hollander A, et al. Identification and characterisation of the retinitis pigmentosa 1-like1 gene (*RP1L1*): a novel candidate for retinal degenerations. *Eur J Hum Genet* 2003;11:155-162.
- Bowne SJ, Daiger SP, Malone KA, et al. Characterization of *RP1L1*, a highly polymorphic paralog of the retinitis pigmentosa 1 (*RP1*) gene. *Mol Vis* 2003;9:129-137.
- Pierce EA, Quinn T, Meehan T, et al. Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1999;22:248-254.
- Sullivan LS, Heckenlively JR, Bowne SJ, et al. Mutations in a novel retina-specific gene cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1999;22:255-259.
- Jacobson SG, Cideciyan AV, Iannaccone A, et al. Disease expression of *RP1* mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1898-1908.
- Yamashita T, Liu J, Gao J, et al. Essential and synergistic roles of *RP1* and *RP1L1* in rod photoreceptor axoneme and retinitis pigmentosa. *J Neurosci* 2009;29:9748-9760.
- Lyons JS. Non-familial occult macular dystrophy. *Doc Ophthalmol* 2005;111:49-56.
- Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Documenta Ophthalmologica* 2009;118:69-77.
- Hood DC, Bach M, Brigell M, et al. ISCEV guidelines for clinical multifocal electroretinography (2007 edition). *Documenta Ophthalmologica* 2008;116:1-11.
- Usui T, Tanimoto N, Ueki S, et al. ERG rod a-wave in Oguchi disease. *Vision Research* 2004;44:535-540.
- Srinivasan VJ, Monson BK, Wojtkowski M, et al. Characterization of outer retinal morphology with high-speed, ultra-high-resolution optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1571-1579.
- Miyake Y. *Electrodiagnosis of Retinal Diseases*. Tokyo, Japan: Springer-Verlag; 2006.
- Nakamura M, Kanamori A, Seya R, et al. A case of occult macular dystrophy accompanying normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2003;135:715-717.
- Anderson DH, Fisher SK, Steinberg RH. Mammalian cones—disk shedding, phagocytosis, and renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17:117-133.
- Fernandez EJ, Hermann B, Povazay B, et al. Ultrahigh resolution optical coherence tomography and pancorrection for cellular imaging of the living human retina. *Opt Express* 2008;16:11083-11094.
- Fujinami K, Tsunoda K, Hanazono G, et al. Fundus autofluorescence in autosomal dominant occult macular dystrophy. *Arch Ophthalmol* 2011;129:579-602.



# 補体への招待

■編集

大井 洋之 鶴見西口病院 院長

木下 タロウ 大阪大学微生物病研究所 教授

松 下 操 東海大学工学部生命化学科 教授



## 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科生体機能科学分野 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

### 木下タロウ

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)/CRlg
- 3-3 免疫複合体の可溶化とクリアランス (関根英治) 88  
補体による免疫複合体の可溶化/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合体/補体受容体1(CR1)の構造と発現/免疫複合体病とは/免疫複合体病の発症機序/血清病(serum sickness)/その他の免疫複合体病

### 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) (鷗沼 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

系球体における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<sup>1)</sup>。

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増減す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り、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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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

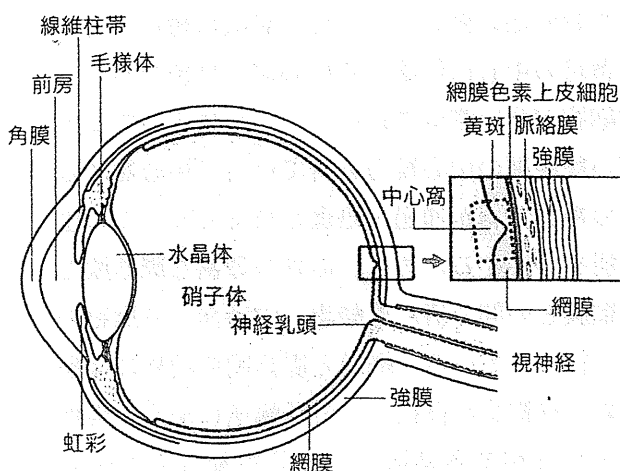
膜に緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)を感染させた実験では、炎症反応は観察されていない。さらに、遺伝子改変によってC5因子遺伝子が欠損したマウスにおいても炎症反応は観察されていない。炎症反応の行き過ぎから角膜を保護するために、MCP、DAF、Crry、CD59などの膜結合型補制御蛋白質が高発現しているが、感染する細菌によってはホスホリパーゼなどの酵素を産生し、角膜表面からDAFやCD59が脱落する危険性がある。角膜における可能性のある炎症抑制薬として、アナフィラトキシンをターゲットにした抑制薬が有効と考えられている。

### 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%、フォークト・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- $\gamma$ 、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、発症晩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、視神経の委縮、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<sup>5)</sup>。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)。

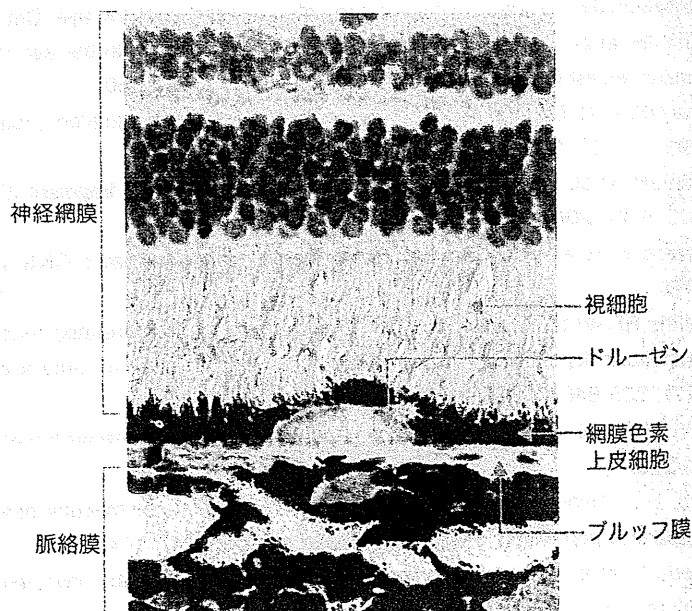
ドルーゼンの蓄積が黄斑を中心に広範囲に及ぶと、これに接する網膜色素上皮細胞は徐々に萎縮し、黄斑部の視細胞も障害されて萎縮型加齢黄斑変性となる。これは脈絡膜から視細胞に向かって黄斑部で血管新生が起こる滲出型加齢黄斑変性と区別される。萎縮型は白人での頻度が高く、滲出型は日本人に多いことが知られている。ドルーゼンの生成メカニズムはまだ十分に解明されていないが、遺伝子多型、視細胞を保護する不飽和脂質(DHA)の光酸化分子に対する自己抗体、アミロイドβの蓄積によるマクロファージの誘導、ウイルス感染による炎症など複数の原因が考えられている。この結果、ドルーゼンや網膜色素上皮細胞に補体の活性化が確認されており、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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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*<sup>-/-</sup>)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<sup>9)</sup>。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



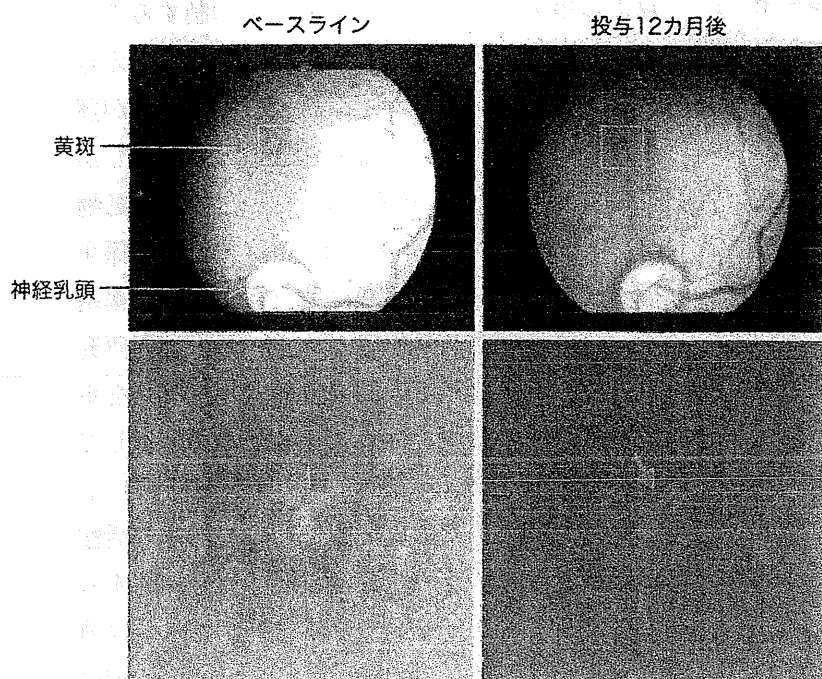
およびC5b (AcPepA、岡田秀親) 抑制薬の効果を研究中である。先行している Compstatin については、実験に用いた4頭全頭について、一部のドルーゼンについて消失していく様子が観察された(図3)。AcPepAについても同様な研究結果が期待されている。

### 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 プロベルジン
  - 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,<sup>1</sup> Hisatomo Takahashi,<sup>1</sup> Yoko Goto-Fukuura,<sup>1</sup> Tsutomu Igarashi,<sup>2</sup> Masakazu Akahori,<sup>3</sup> Shuhei Kameya,<sup>1</sup> Takeshi Iwata,<sup>3</sup> Atsushi Mizota,<sup>4</sup> Kunihiko Yamaki,<sup>1</sup> Yoza Miyake,<sup>5,6</sup> Hiroshi Takahashi<sup>2</sup>

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