

201231073A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

オカルト黄斑ジストロフィーの
効果的診断法の確立および病態の解明

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 角田 和繁

平成 25 年(2013)5 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

オカルト黄斑ジストロフィーの
効果的診断法の確立および病態の解明

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 角田 和繁

平成 25 年(2013)5 月

目 次

I. 総括研究報告書

オカルト黄斑ジストロフィーの効果的診断法の確立および病態の解明
角田和繁

II. 分担研究報告書

1. 新たな遺伝性網膜・黄斑疾患の大型動物モデルの確立
近藤峰生
2. オカルト黄斑症（三宅病）臨床的特徴の検索
篠田 啓
3. 遺伝性網膜疾患の症例収拾，遺伝子解析および原因遺伝子の探索
國吉一樹
4. オカルト黄斑ジストロフィーの遺伝子解析
町田繁樹
5. 黄斑ジストロフィー患者の表現系と遺伝子変異の関連の探索
上野真治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I . 総括研究報告書

オカルト黄斑ジストロフィーの効果的診断法の確立および病態の解明

研究代表者 角田和繁

東京医療センター臨床研究センター視覚生理学研究室長

研究要旨：オカルト黄斑ジストロフィーは遺伝性の黄斑部変性症であり難治性の視力低下を来す疾患である。平成22年度に「フィジビリティスタディ」として開始された1年目の研究において、我々は優性遺伝型オカルト黄斑ジストロフィーの原因が視細胞の構造タンパク「*RP1L1*」の異常によるものであることを解明した。しかし、本疾患には家族性タイプから弧発例タイプまでさまざまな亜型があり、完全な病態の把握には至っていない。本研究の目的は、大家系、多数の小家系・弧発例の疾患病態を多施設間で詳しく調べることで、本疾患の臨床的および分子遺伝学的病態を解明すること。また合わせて、診断基準を明確にすることである。

本研究の構成は（A）臨床病態調査、および（B）原因遺伝子検索から構成され、それぞれにおいて詳細な眼科的検査・家系調査、および *RP1L1* 遺伝子のダイレクトシーケンスおよび次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析が行われた。また、その結果は各分担者および協力者にフィードバックされ、原因検索のために必要な更なる家系調査を展開していった。

本年度は、約30症例のオカルト黄斑ジストロフィーを解析することができた。また、*RP1L1* 遺伝子以外にも、本疾患の発症に関与すると思われる遺伝子Aが見出され、さらに本疾患の *RP1L1* 変異について新規の変異が複数個見つかった（いずれも現在論文投稿に向けて確認中）。また、オカルト黄斑ジストロフィーの病態が、形態学的にも単一でないことが見出され、これまでの概念を再検討する必要性が明らかになった。

これらの研究結果はオカルト黄斑ジストロフィーの病態理解を格段に深め、臨床的に意義の大きい成果と思われた。ただし本疾患の定義、診断基準については、さらに表現型-遺伝子型についての詳細な検討結果を待たなければならないとの認識を持つに至った。

今後は広く黄斑ジストロフィー、網膜ジストロフィーに調査の範囲を広げ、遺伝子解析についても全エクソン解析のような広範な解析法によって可能な限り病態解明に向けた研究を進めていく予定である。

研究分担者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

近藤峰生 三重大学大学院医学系研究科
臨床医学系講座眼科学 教授

篠田 啓 帝京大学医学部眼科学講座 准教授

国吉一樹 近畿大学医学部眼科学教室 講師

町田繁樹 岩手医科大学眼科学講座 准教授

上野真治 名古屋大学医学部眼科学教室 助教

A. 研究目的

オカルト黄斑ジストロフィーは遺伝性の黄斑部変性症であり難治性の視力低下を来す疾患である。平成22年度に「フィジビリティスタディ」として開始された1年目の研究において、我々は優性遺伝型オカルト黄斑ジストロフィーの原因が視細胞の構造タンパク「*RP1L1*」の異常によるものであることを解明した。しかし、本疾患には家族性タイプから弧発例タイプまでさまざまな亜型があり、完全な病態の把握には至っていない。本研究の目的は、大家系、多数の小家系・弧発例の疾患病態を多施設間で詳しく調べることで、本

疾患の臨床的および分子遺伝学的病態を解明すること。また合わせて、診断基準を明確にすることである。

研究期間年目において、新たに 30 症例のオカルト黄斑ジストロフィー症例を解析し、眼科的検査および遺伝子検査を行う。また、臨床的特徴が類似している「眼底所見の正常な錐体ジストロフィー」の患者についても同様の調査を行う。

B. 研究方法

本研究の構成は (A) 臨床病態調査、および (B) 原因遺伝子検索から構成された。

(A) 臨床病態調査については、東京医療センターを中心として、岩手医大、新潟大、帝京大、名古屋大、三重大、愛知医大、近畿大の各分担および協力施設において、患者について詳細な眼科的検査を行った。家族例の場合、可能な限り家系調査を行い、家系内の罹患者および健常者についても眼科的検査を行った。得られた臨床的な情報については、研究代表者が収集、管理した。

(B) 原因遺伝子検索については、それぞれの施設で得られた患者および健常者の末梢血が東京医療センター分子細胞生物学研究室に送られ、保管された。抽出された DNA は、まず *RP1L1* 遺伝子のダイレクトシーケンスによって変異の有無を確認した。*RP1L1* 遺伝子に変異が得られなかった検体については、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、候補となる複数の遺伝子変異を特定した。それらのデータについて、家系内の患者および健常者の解析結果と比較することで更に原因遺伝子の候補を絞り込んだ。

上記の A および B は同時に進行された。遺伝子検査の解析結果については、ダイレクトシーケンスおよび全ゲノムシーケンスの結果が出るたびに、研究代表者を通じて各分担者および協力者にフィードバックされ、原因検索のための更なる家系調査の必要性について議論された。

また、患者の臨床的特徴と遺伝子解析情報を統合する目的で 6 ヶ月毎に研究班の全体会議を開催し、研究状況について詳細な情報交換を行った。会議では、国内外の最新の研究成果の共有も目的とした。

さらに一部の症例については、東京医療センターの症例登録システムを用いて各施設の臨床情報を常に閲覧できる体制を整えた。また上記以外にも、各分担者間で必要に応じて頻繁にメール等

で情報交換を行った。

C. 研究結果

＜東京医療センター、総括＞

1) オカルト黄斑ジストロフィーと診断された患者のうち、平成 24 年 12 月の時点で 49 症例について *RP1L1* 遺伝子の解析が終了した。そのうち、27 症例において 45 番目および 960 番目のアミノ酸置換が認められた。さらに 4 症例については、新たに同定された 1199 番目のアミノ酸置換が認められた。合計すると、オカルト黄斑ジストロフィー患者 49 例のうち、31 症例において *RP1L1* 遺伝子に既知の変異が認められた。

現時点で、18 症例のオカルト黄斑ジストロフィーについては原因遺伝子が特定されていないが、このうち 4 症例については、*RP1L1* 遺伝子のこれまでに報告されていない領域に頻度の低い多型が複数個認められている。現在、これらの多型と疾患発症との関係について調査中である。

2) 原因遺伝子の特定できないオカルト黄斑ジストロフィー症例について、全エクソン解析を行い、疾患と関連のある遺伝子異常を抽出した。家系内での比較の結果、他の網膜疾患の原因遺伝子として知られる **遺伝子 A** が原因候補として考えられた。現在、確認のための追試を行っている。

3) 臨床的にオカルト黄斑ジストロフィーと「眼底所見の正常な錐体ジストロフィー」は非常に近い関係にある。これまでに、8 症例について原因遺伝子の検索を行ったところ、1 家系 3 症例において *RP1L1* 遺伝子のこれまでに報告されていない領域に頻度の低い多型が認められた。現在、この多型と疾患発症との関係について追加調査中である。

4) *RP1L1* 変異を持つ症例のうち、一部 (10%程度) の症例においては、全視野 ERG における錐体反応の振幅が若干低下していた。これは、オカルト黄斑ジストロフィーの本来の定義である「全視野 ERG が正常」という特徴と相容れないものである。また、光干渉断層計を用いた解析により、黄斑部の視細胞構造が正常であるにもかかわらず黄斑部網膜電図が消失している症例が少数認められた。これらにより、本疾患の病態についての認識を根本的に見直す必要があること

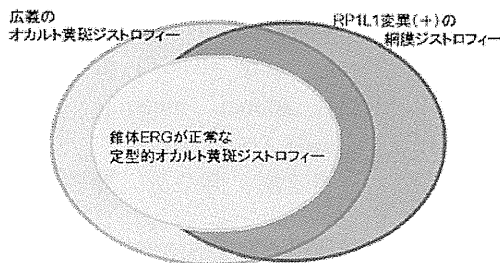
が示唆された。

また、各分担施設においてはそれぞれが本疾患の症例を収集した以外に、近藤が遺伝性網膜・黄斑疾患モデルの確立に向けた基礎的研究を行い、篠田は本疾患と視神経疾患の鑑別の際に重要なパターン視覚誘発電位の検討を行った。

以上、1)～4)をまとめると、

* オカルト黄斑ジストロフィー49症例、および「眼底の正常な錐体ジストロフィー」8症例の検討により、オカルト黄斑ジストロフィーが *RP11* 遺伝子変異以外の原因でも発症し得ることが明らかになった。また、*RP11* 変異は、オカルト黄斑ジストロフィー以外の表現型にも関与していることが明らかになった(下図参照)。

＜本研究で明らかになったオカルト黄斑ジストロフィーの病態＞



- * これらの研究結果はオカルト黄斑ジストロフィーの病態理解を格段に深め、臨床的に意義の大きい成果と思われる。ただし本疾患の定義、診断基準については、さらに表現型-遺伝子型についての詳細な検討結果を待たなければならないとの認識を持つに至った。
- * 世界的にこれほど多くの症例について詳細な検討がなされている研究はなく、国際的な意義は大きいと思われる。また、現在、遺伝子治療を初めとした網膜ジストロフィーの根本治療が検討され始めていることもあり、その第一歩として表現型-遺伝子型について明らかにしたことは、今後の治療研究を進める上でも発展性のある成果と考えられた。

D. 考察

今回の研究プロジェクトにおいて達成できた目標として、以下が挙げられた。

* 通常は非常に遭遇する機会の少ないオカルト黄斑ジストロフィーであるが、共同研究体制によ

って49症例という多数例を収集することができた(当初の目標は30症例)。

* *RP11*遺伝子以外にも、本疾患の発症に関与すると思われる遺伝子Aが見出された(現在論文投稿に向けて確認中)。

* 本疾患の*RP11*変異について、新規の変異が複数個見つかった(現在論文投稿に向けて確認中)。

* オカルト黄斑ジストロフィーの病態が、形態学的にも単一でないことが見出され、これまでの概念を再検討する必要性が明らかになった。

また、今回は達成できなかった目標として以下が挙げられる。

* 本疾患についての「表現型-遺伝子型関連」は1対1対応ではなく、また表現型も当初の概念より幅が広いことが分かり、研究期間内に診断基準を明確に設定することができなかった。

研究期間終了後の展開であるが、本疾患の多くは*RP11*変異と関連しているが、同時に他の網膜ジストロフィーとの間にも遺伝子型および表現型に関連があることが明らかになった。このため、本疾患の病態を完全に理解するためには、広く黄斑ジストロフィー、網膜ジストロフィーに調査の範囲を広げ、遺伝子解析についても全エクソン解析、全ゲノム解析のような広範な解析が必要であることが分かった。

今後とも可能な限り病態解明に向けた研究を進めていく予定である。

また、臨床現場等への研究成果の活用についてであるが、これまで本疾患は眼科医においてすら認知度が低く、ほとんどの症例は複数の一般眼科医に誤診された上で確定診断に至っている。本研究期間における学会、講習会等での広報活動を通じて、我々はまず眼科医に対する本疾患の啓蒙、および将来的な治療法の確立に向けた遺伝学的検査の重要性等を訴えてきた。それらの活動は一定の成果を得たと思われる。

E. 結論

多施設共同研究による多数症例の臨床的調査および遺伝子検査により、これまでに分からなかったオカルト黄斑ジストロフィーの性質、病態がより鮮明になった。今後、他の原因遺伝子の解明、*RP11* 遺伝子の詳細な機能解析を引き続き行うと

ともに、本疾患の全体像を明らかにすることでその診断がより一般的かつ正確に行われることを目指したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujinami K, Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Tsunoda K, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Michaelides M, and Webster AR. The Clinical Effect of Homozygous ABCA4 Alleles in 18 Patients. *Ophthalmology* 2013 in press
- 2) Fujinami K, Lois N, Davidson AE, Mackay DS, Hogg CR, Stone EM, Tsunoda K, Tsubota K, Bunce C, Robson AG, Moore AT, Webster AR, Holder GE, Michaelides M. A Longitudinal Study of Stargardt Disease: Clinical and Electrophysiologic Assessment, Progression, and Genotype Correlations. *Am J Ophthalmol.* 2013 Mar 14. pii: S0002-9394(13)00074-3. doi: 10.1016/j.ajo.2013.01.018. [Epub ahead of print]
- 3) Watanabe K, Tsunoda K, Mizuno Y, Akiyama K, Noda T. Outer retinal morphology and visual function in patients with idiopathic epiretinal membrane. *JAMA Ophthalmol.* 2013 Feb 1;131(2):172-177
- 4) Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, and Miyake Y. Clinical characteristics of occult macular dystrophy in family with mutation of RP1L1 gene. *Retina*, 2012 Jun;32(6):1135-1147
- 5) Hanazono G, Tsunoda K, Kazato Y, Suzuki W, Tanifuji M. Functional topography of rod and cone photoreceptors in macaque retina determined by retinal densitometry. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(6), 2796-2803, 2012.5
- 6) 角田和繁. 三宅病の現状と展望. *日本臨床*, 71(2), 2012, 355-364
- 7) 角田和繁. OCTの「コストライン」について. *Retina Medicine*. 1, 1, 90-94, 2012.10
- 8) 角田和繁. functional OCTの進歩. 専門医のための眼科診療クオリファイ 14:網膜機能検査 A to Z. 215-218, 中山書店, 2012/9/25

2. 学会発表

- 1) Tanaka H, Tsunoda K, Fujinami K, Kubono H, Shinoda K, Akahori M, Iwata T and Miyake Y. Variation in photoreceptor morphology in patients with occult macular dystrophy without *RP1L1* gene mutation. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV), 50th Symposium, Valencia, Spain. 2012.6.7
- 2) Nakamura N, Tsunoda K, Fujinami K, Shinoda K, Akahori M, Iwata T, Tomita K, Hatase T, Usui T, and Miyake Y. Long-term follow-up of four Japanese patients with *KCNV2*-related retinopathy. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV), 50th Symposium, Valencia, Spain. 2012.6.7
- 3) Suzuki W, Hanazono G, Nanjo T, Ito K, Nishiyama J, Tanifuji M, Tsunoda K. Imaging of rod and cone photoreceptor activities using functional optical coherence tomography (fOCT) in the macaque retina. ARVO annual meeting 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2012.5.7
- 4) 角田和繁、田中宏樹、藤波芳、篠田啓、赤堀正和、岩田岳、三宅養三. *RP1L1* 変異 (p.Ser1199Cys) を持つオカルト黄斑ジストロフィー4名の臨床的特徴. 第66回日本臨床眼科学会. 名古屋. 2012.10.5
- 5) 中村奈津子、角田和繁、藤波芳、篠田啓、富田香、畑瀬哲尚、臼井知聡、赤堀正和、岩田岳、三宅養三. 杆体反応の増強をともなう錐体ジストロフィー4例の長期経過. 第66回日本臨床眼科学会. 名古屋. 2012.10.5
- 6) 角田和繁. シンポジウム11 網膜変性と視機能解析の最先端. 「三宅病研究の最前線」. 第116回日本眼科学会総会、東京、2012年6月4日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

新たな遺伝性網膜・黄斑疾患の大型動物モデルの確立

研究分担者 近藤峰生
三重大学大学院医学系研究科臨床医学系講座眼科学 教授

研究要旨： 遺伝性の網膜・黄斑疾患の病態解明と治療法の開発に向けて、動物モデルの確立は重要である。特に、犬、猫、ウサギなどによる動物モデルは、眼球の大きさがヒトに近いために重要な大型動物モデルになりうる。今回我々は、完全型先天停在性夜盲（cCSNB）の特徴を示す犬を見いだし、その系統を樹立するとともに網膜機能を研究したので報告する。動物実験施設で飼育されていたビーグル犬の中に夜盲を呈する犬が存在することが疑われ、この犬の眼科的所見を研究した。この犬の網膜電図は、ヒトのcCSNBの波形とよく類似していた。行動実験では、明所での行動は正常であったが暗所になると歩行が鈍くなり、衝突を繰り返した。家系図から常染色体劣性遺伝が疑われたが、遺伝子検査では、*GRM6*、*TRPM1*、*GPR179*の3つの遺伝子に異常はみられなかった。今回調査したビーグル犬は、世界で初めてのcCSNBの犬動物モデルになりうると思われ、cCSNBの病態解明や治療法の開発に有用である可能性があると考えられた。

A. 研究目的

遺伝性の網膜・黄斑疾患の病態解明と治療法の開発に、動物モデルは重要な役割を果たす。特に、犬、猫、ウサギなどによる動物モデルは、眼球の大きさがヒトに近いために重要な大型動物モデルになりうる。

先天停在性夜盲の完全型（complete-type CSNB: cCSNB）は、視細胞からON型双極細胞への伝達が障害されている疾患であり、ヒトでは現在5つの原因遺伝子（*GRM6*、*NYX*、*TRPM1*、*GPR179*、*LRIT3*）が報告されている。この疾患の動物モデルとしてはこれまでウマとマウスの報告があるのみであり、犬や猫などの中型動物における報告はない。今回我々は、cCSNBの表現型を示すと考えられた犬の1家系を詳細に研究したので報告する。

B. 研究方法

武田薬品株式会社の動物実験施設の中に、暗所での行動が鈍いビーグル犬がいることがわかり、このビーグル犬と正常ビーグル犬との交配を繰り返し、家系図を作製するとともに遺伝形式を決定した。ビーグル犬で明らかな夜盲がある個体を網膜電図（ERG）で調べた。網膜組織の変化を光学顕微鏡と電子顕微鏡で調べた。暗所と明所で迷

路歩行による行動実験を行った。この家系のビーグル犬からDNAを抽出して、ヒトで*GRM6*、*TRPM1*、*GPR179*、*LRIT3*に相当する遺伝子に異常がないかを調べた。

（倫理面への配慮）

全ての実験は三重大学動物実験委員会の承認を得て行なった。全ての実験はARVOの動物実験規定に従った。

C. 研究結果

夜盲犬の網膜電図（ERG）では、杆体応答は消失し、錐体応答では、刺激開始時のON反応のみ減弱していたがOFF反応は残存していた（図1）。

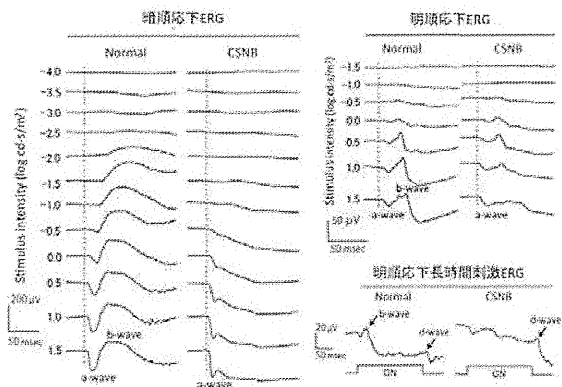


図1: 正常犬と夜盲犬のERGの結果

交配による遺伝形式の検討では、cCSNB 犬の遺伝形式は常染色体劣性と考えられた (図 2)。

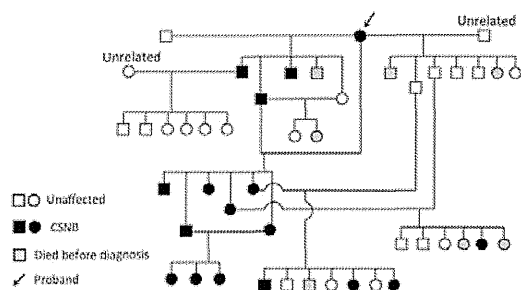


図 2: 夜盲犬の家系図

網膜の組織は光学顕微鏡、電子顕微鏡ともに正常であった (図 3)。明所行動は正常で、暗所になると歩行が鈍くなり衝突を繰り返した。遺伝子検査では、*GRM6*, *TRPM1*, *GPR179* の遺伝子に異常はみられなかった。

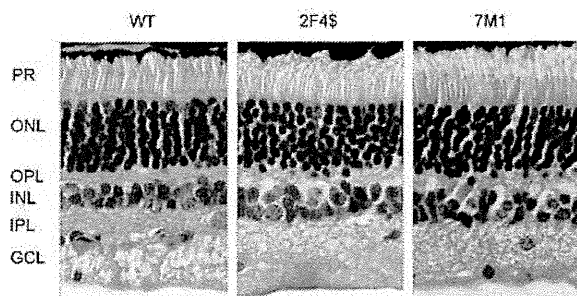


図 3 正常犬 (左) と夜盲犬 (中、右) の網膜の光学的顕微鏡所見

D. 考察

今回我々が研究した夜盲犬は、ERG がヒトの cCSNB と極めて類似しており、行動実験で明らかかな夜盲がみられた。生後 5 年以上にわたって眼底も蛍光眼底造影も正常であり、光顕所見も電顕所見も正常であった。交配の結果、遺伝形式は常染色体劣性と考えられた。以上の結果により、この犬家系はヒトの常染色体劣性の cCSNB と同じ表現系を有していると考えられた。

ヒトでは常染色体劣性の cCSNB の原因遺伝子はこれまで 4 つの遺伝子がわかっているが、今回そのうちの 3 つ (*GRM6*, *TRPM1*, *GPR179*) に

異常はみられなかった。現在、他の遺伝子について追加実験を行うとともに、ペンシルバニア大学と共同研究を行って全ゲノム解析を行って原因遺伝子の同定を目指している。

E. 結論

今回我々が研究した夜盲を呈する犬の家系は、ヒトの cCSNB の重要な大型動物モデルになりうると考えられた。犬の眼球は大きいため電気生理学的検査や行動検査にも信頼性が高い。今後は同時に遺伝子治療の可能性についても見当を続けていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui Y, Tsukitome H, et al. Peripheral capillary nonperfusion and full-field electroretinographic changes in eyes with frosted branch-like appearance retinal vasculitis. *Clin Ophthalmol.* 2013;7:137-40.
- 2) Jones BW, Kondo M, et al. Retinal remodeling. *Jpn J Ophthalmol.* 2012;56:289-306, 2012.
- 3) Morimoto T, Kanda H, Kondo M, et al. Transcorneal electrical stimulation promotes survival of photoreceptors and improves retinal function in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 28; 53(7): 4254-61.
- 4) Hosono K, Ishigami C, et al. Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. *PLoS One.* 2012;7(2):e31036.
- 5) Muraoka Y, Ikeda HO, et al. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. *PLoS One.* 2012;7(4):e36135.
- 6) Omori Y, Araki F, et al. Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *J Neurosci.* 2012;32:6126-37.
- 7) Nojima K, Hosono K, et al. Clinical features of a Japanese case with Bothnia dystrophy. *Ophthalmic Genet.* 2012 Jun;33:83-8.

2. 学会発表

1) Kondo M, Ueno S, Terasaki H, Hayashi T, Ishigami C, Takahashi M. Retinal degeneration in Oguchi disease with SAG mutations. 50th International Society of Clinical Electrophysiology of Vision. Valencia, Spain. June 6, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

- 1) Miyake Y et al. Congenital stationary night blindness with negative electroretinogram: a new classification. *Arch Ophthalmol*. 1986;104:1013-1020.
- 2) Witzel DA, et al. Congenital stationary night blindness: an animal model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1978;17:788-795.

オカルト黄斑症（三宅病）臨床的特徴の検索

研究分担者 篠田啓
帝京大学医学部 眼科学講座 准教授

研究要旨：黄斑疾患と視神経疾患の鑑別の際に重要なパターン視覚誘発電位(pVEP)の刺激モニターについて、近年社会的に CRT から移行しつつある LCD の有用性を検討した。LCD を刺激装置として用いた場合でも従来の N75 や P100 成分を有する類似の pVEP 波形が得られることが分かった。しかし、LCD は生来パターン反転、特に黒から白の際に時間的な遅れが生じる。このため画面全体としてフラッシュ効果を生じ、これが網膜電図(ERG)を惹起することが分かった。この ERG 成分が pVEP に混入しており、このことを踏まえて pVEP を解釈する必要がある。

A. 研究目的

オカルト黄斑症（三宅病）は遺伝性黄斑ジストロフィーに分類される両眼性網膜疾患で、進行性の視力低下と、中心網膜感度低下を認めるものの、検眼鏡所見、蛍光眼底所見、および全視野網膜電図(electroretinogram:ERG)で異常を示さないと言う特徴を有する。しばしば視神経疾患と間違われ、その鑑別診断に視覚誘発電位 (visual evoked potential:VEP)が有用となる可能性がある。パターン VEP(pVEP)記録の際の刺激装置として CRT ディスプレイが一般的に用いられているが、近年液晶ディスプレイ(LCD)の普及により今後 CRT ディスプレイの入手は困難になると予想される。そこで我々は LCD を用いて pVEP を記録し、刺激装置としての有用性を検討した。

B. 研究方法

刺激および記録条件は国際基準に則り、モニター中心輝度：CRT 80 cd/m², LCD 80 cd/m²、コントラスト：97%として、健常篤志家（男 10 名女 19 名、平均年齢 24.2 ± 6.5 歳）を対象に、無散瞳状態で右眼を刺激して pVEP を記録した。

（倫理面への配慮）健康被害のない無侵襲の検査であること、研究の目的を十分説明した。

C. 研究結果

図 1 に代表波形を示す。実線は CRT 点線は LCD 刺激による記録波形である。LCD を刺激装置として用いた場合に

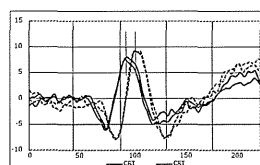


図 1

も、従来通り、N75 や p100 に相当する波形成分を含む類似波形が記録できた。しかしながら、画面の輝度変化を記録したところ、図 2,3 のようにチェッカーボードの反転、特に黒から白に反転する際に LCD では遅れが認められた。

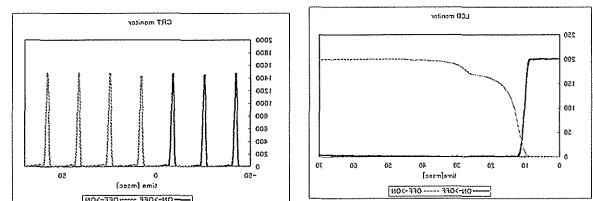


図 2 CRT の画面輝度変化図 3 LCD の画面輝度変化

この遅れにより、LCD 刺激では網膜電図(ERG)が記録される可能性が考えられたため、モニターの前に拡散板を置いて ERG を記録したところ、LCD 刺激では ERG が記録された。

D. 考察

LCD 刺激ではチェッカーボードの反転の際に遅れが生じ、これがフラッシュ刺激となって ERG を惹起するため、pVEP 波形には ERG 成分が混入していることが分かった。

E. 結論

LCD を用いた刺激でも N75, P100 成分を有する反応が得られたが、CRT と比較して振幅の増加と潜時延長を認めた。

その原因としてフラッシング効果および、輝度変化のプロフィールの違いが影響していると考

えられた。

このことを踏まえた上で、pVEP の刺激装置としての使用が可能と考えられた。

われわれはこの刺激画面の立ち上がりの遅れにより生じるフラッシュ刺激としてのプロフィールをフラッシュ刺激効果と呼び、今後種々のLCD モニターで検証を行い、また、フラッシュ効果を可能な限り軽減する方法を探索する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujita K, Matsumoto CS, Imamura Y, Satofuka S, Shinoda K, Mizutani Y, Yuzawa M, Mizota A, Oda K. Low luminance visual acuity in patients with central serous chorioretinopathy. *Clin Exp Optometry*. 2013 Jan;96(1):100-5. Epub 2012 Sep 10.
- 2) Hanazono G, Shinoda K, Obazawa M, Imamura Y, Matsumoto CS, Satofuka S, Mizota A, Ando Y. Valsalva hemorrhagic retinopathy during cheerleading training (Ouendan). *Retinal Cases & Brief Reports*. 7(1):78-81, Winter 2013.
- 3) Mochizuki Y, Ohkuma S, Shinoda K, Matsumoto CS, Satofuka S, Mizota A. A case of unilateral peripheral cone dysfunction. *Case Report in Ophthalmol*. 2012 May;3(2):162-8.
- 4) 堀野武、内田敦郎、持丸博史、厚東隆志、永井紀博、篠田肇、篠田啓、大出尚郎、小沢洋子、坪田一男。ポリコナゾール内服による視覚障害から視放線の病変が見つかった再生不良性貧血の一例。眼科臨床紀要, 5 (12) : 1129-1133、2012.

2. 学会発表

- 1) Matsumoto CS, Nakagomi R, Shinoda K, Matsumoto H, Minoda H, Seki K, Mizota A. Binocular Interaction in Visually Evoked Cortical Potential elicited by simultaneous, but asymmetric binocular stimuli. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (50 th;バレンシア, スペイン). 2012.6. 4-8.
- 2) Terauchi G, Matsumoto CS, Nakagomi R,

Matsumoto H, Seki K, Shinoda K, Mizota A. Multifocal electroretinogram elicited using liquid crystal display. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (50th;バレンシア, スペイン). 2012.6. 4-8.

- 3) Tanaka H, Tsunoda K, Fujinami K, Kubono H, Shinoda K, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. Variation in photoreceptor morphology in patients with occult macular dystrophy without *RP1L1* gene mutation. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (50th;バレンシア, スペイン). 2012.6. 4-8.
- 4) Kawai S, Matsumoto CS, Terauchi G, Shinoda K, Mizota A. A case of malignant lymphoma showing selectively decreased on response in the photopic ERG. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (50 th;バレンシア, スペイン). 2012.6. 4-8.
- 5) Nakamura N, Tsunoda K, Fujinami K, Shinoda K, Akahori M, Iwata T, Tomita K, Miyake Y. Long-term follow-up of four Japanese patients with *KCNV2*-related retinopathy. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (50 th;バレンシア, スペイン). 2012.6. 4-8.
- 6) Shinoda K, Matsumoto CS, Matsumoto H, Seki K, Nakatsuka K, Mizota A. Optimal pulse cycle of electrical retinal stimulation from macaque monkey. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (50th;バレンシア, スペイン). 2012.6. 4-8.
- 7) Wakasa R, Kimura I, Shinoda K, Imamura Y, Matsumoto CS, Seki K, Mizota A, Murakami A. Foveal function and outer retinal thickness in AZOOR-complex diseases. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (50th;バレンシア, スペイン). 2012.6. 4-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

遺伝性網膜疾患の症例收拾，遺伝子解析および原因遺伝子の探索

研究分担者 國吉一樹
近畿大学医学部眼科学教室 講師

研究要旨：オカルト黄斑変性症（三宅病）と眼底所見が正常な錐体ジストロフィを対象に，その網膜機能解析と遺伝子検索を行った．方法は，遺伝性網膜変性疾患が疑われた症例に，視力検査，眼底検査，蛍光眼底造影検査，網膜電図(ERG)検査，多局所 ERG 検査，暗順応検査，光干渉断層計(OCT)検査を行い，診断した．同意を得たケースに対して採血を行い，その検体は東京医療センターに送付して遺伝子解析を行った．平成 24 年度は 9 例の採血を行ったが，現在までに *RP1L1* 遺伝子に異常がみつかったものはない．なお，本研究はすべて近畿大学倫理委員会承認された方法・書式にのっとり行った．

A. 研究目的

1991 年に本邦の Miyake らは，眼底や造影検査所見に異常がみられず，黄斑部局所 ERG のみで異常がある症例をはじめて報告し，1996 年に *occult macular dystrophy*（オカルト黄斑変性，OMD）と命名した．その後の研究により，この疾患は当初予想されたよりもその罹患率は高いことが近年明らかとなってきた．

OMD は常染色体優性遺伝型，常染色体劣性遺伝型，孤発型いずれも報告されており，そのうち常染色体優性遺伝型の OMD では，2010 年に Akahori らにより *RP1L1* 遺伝子に異常が初めて報告され，三宅病と呼ばれるに至っている．

一方，眼底所見が正常な錐体ジストロフィについては過去に数十例の報告がある．これらの錐体ジストロフィでは，*CRX*，*GUCY2D*，*KCNV2*，そして *CNGB3* 遺伝子に異常が報告されている．

本研究の目的は，これらの OMD と眼底所見が正常な錐体ジストロフィについて，新規遺伝子異常を発見することや *RP1L1* 遺伝子異常との関連を究明することが主たる目的である．またこれらの網膜変性疾患について既知の遺伝子異常を調べることにより，その異常の発生率や臨床表現型との関連を調べることがもう一つの目的である．

B. 研究方法

まず，近畿大学医学部遺伝子倫理委員会に研究内容について書類で申請を行い，平成 23 年 2 月 2 日に承認を得た．

次に，OMD や眼底が正常な錐体ジストロフィなどの遺伝性網膜変性症が疑われる症例に対して，視力検査，眼圧検査，眼底検査および眼底写真撮影，フルオレセイン蛍光眼底造影検査，ゴールドマン視野検査，光干渉断層計(OCT)検査，網膜電図(ERG)検査，多局所 ERG 検査を行った．ERG 検査はトーマー社製 LS-200 と PuREC を用い，国際臨床視覚電気生理学学会による検査プロトコルにしたがって検査を施行した．多局所 ERG 検査は，Veris Science ver.5.0 を用いて検査を行った．その中で，同意を得たケースに対して採血を行い，東京医療センターに検体を送付し遺伝子解析を行った．

（倫理面への配慮）

遺伝子採血についての説明・同意・方法は，すべて近畿大学倫理委員会に申請し，承認された方法を遵守し，倫理委員会で規定された用紙を使用して施行した．

C. 研究結果

平成 24 年度に遺伝子採血に同意をいただき，遺伝子検索を行った症例は 9 例であった．うち 4 例は OMD，3 例は OMD の同胞で視機能が正常なもの，1 例は眼底所見が正常な錐体ジストロフィ，1 例がその同胞で視機能が正常なものであった．OMD 4 例のうち 2 例は兄弟例であった．

現在遺伝子検索中であるが，今までのところ *RP1L1* 遺伝子に異常がみつかったものはない．

なお上記以外に，いったん同意を得て採血を行

ったが、その後同意を撤回されて検体を廃棄した OMD とその同胞が 2 例あった。

D. 考察

平成 24 年度に検体を採取した OMD は、典型的なものが少なく、現在までに *RPILI* 遺伝子に異常はみつかっていない。現在他の遺伝子についても検索中であるのでその結果を待ちたい。

E. 結論

平成 24 年度は、9 例の OMD ないし眼底が正常な錐体ジストロフィとその同胞について *RPILI* 遺伝子異常を検索したが、異常は現在まで発見されていない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Nakao A, Sato T, Utsumi T, Tsuneoka H, Shimomura Y. Novel mutations in enhanced S-cone syndrome. *Ophthalmology* 2013;120(2):431.e1-6.
- 2) Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Nakao H, et al. A case of bilateral, acquired, and acute dysfunction of short-wavelength-sensitive cone systems. *Doc Ophthalmol* (2012) 125: 75-80

2. 学会発表

- 1) Kazuki Kuniyoshi, Hiroyuki Sakuramoto, Chota Matsumoto and Yoshikazu Shimomura. Relationship between OCT findings and vision in patients with retinitis pigmentosa. ARVO 2012 annual meeting. 2012.5.7
- 2) 國吉一樹. インストラクションコース「やさしい神経眼科」「網膜疾患との接点」. 日本臨床眼科学会. 2012.10.28
- 3) 國吉一樹, 林孝彰, 櫻本宏之, 中尾彰, 内海智博, 常岡 寛, 下村嘉一. Enhanced S-cone Syndrome の遺伝子異常と臨床像. 日本臨床視覚電気生理学会. 2012.10.5
- 4) 國吉一樹, 櫻本宏之, 松本長太, 仲田和代, 下村嘉一, 中尾雄三. Acute zonal occult outer retinopathy における背景光輝度による視野変化. 第 1 回日本視野学会. 2012.5.20

- 5) 國吉一樹, 櫻本宏之, 松本長太, 下村嘉一. 網膜色素変性における黄斑部 OCT 所見と視機能. 第 116 回日本眼科学会総会. 2012.4.3

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

オカルト黄斑ジストロフィーの遺伝子解析

研究分担者 町田繁樹
岩手医科大学眼科学講座 准教授

研究要旨：オカルト黄斑ジストロフィー（OMD）および眼底が正常な錐体ジストロフィー（CD）の遺伝子解析を行うため、OMDとCD症例の臨床データを集積した。明らかな家族歴は無かったが、OMDとCDの臨床所見を呈する各1症例を検出し、それぞれの遺伝子解析を行った。これらの症例ではOMDの既知の遺伝子変異であるRP1L1遺伝子の異常は認められなかった。

A. 研究目的

オカルト黄斑ジストロフィー（OMD）および眼底が正常な錐体ジストロフィー（CD）の遺伝子解析を行うため、OMDとCD症例の臨床データを集積し、遺伝子解析を行う。

B. 研究方法

1. 既往歴：家族歴の調査
2. 眼底所見：詳細な眼底検査を行うとともに、フルオレセイン（FAG）およびインドシアニン赤外蛍光眼底造影（ICGA）を施行する。
3. 網膜電図所見（ERG）：全視野および黄斑局所ERGを記録し、黄斑部の機能低下を証明する。
4. 静的量的視野：中心暗点の有無を確認する。
5. スペクトラルドメイン光干渉断層計（SD-OCT）：黄斑部の微細構造を評価する。
6. 血液採取：血液サンプルを国立感覚器センターに送り、遺伝子解析を行う。採血に際しては、インフォームドコンセントを得る。血液サンプルは匿名化する。

C. 研究結果

上記の検査所見からOMDおよびCDと考えられる症例が各1例あった。症例1は75歳の男性で視力低下を訴え、症状は進行性に徐々に悪化している。視力は両眼（0.5）で、黄斑局所ERGの振幅が低下、脱分極型を呈していた。全視野ERGは、錐体応答が正常下限であった。静的量的視野検査では中心暗点のみられた。OCTではCOSTが不鮮明で、ONLが薄くなっていた。以上の所見からOMDと考えられた。症例2は40歳の男性で、

視力は両眼0.8で、両眼に中心暗点のみられた。黄斑局所ERGの振幅が著明に低下し、錐体応答が減弱していた。明らかな家族歴は無い。眼底所見および蛍光造影所見は正常であった。OCTではCOSTが消失し、IS/OSラインが不鮮明となっていた。以上の所見からCDと考えられた。血液検体の遺伝子解析ではOMDの既知の遺伝子変異であるRP1L1遺伝子の異常は認められなかった。

D. 考察

今回、遺伝子解析を行った2症例は、孤発例と考えられた。これらの症例では、優性遺伝性のOMDの既知の遺伝子異常が認められなかった。従って、孤発例のOMDおよびCDの発症には、優性遺伝性のOMDとは異なった発症メカニズムが関与している可能性がある。

E. 結論

OMDおよびCDの孤発例2症例では、既知の遺伝子変異であるRP1L1遺伝子の異常は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Machida S. Clinical application of photopic negative response to optic nerve and retinal diseases. J Ophthalmol. 2012;2012:397178.
- 2) Yamamoto S, Sugawara T, Murakami A,

Nakazawa M, Nao-I N, Machida S, Wada Y, Mashima Y, Miyake Y. Topical isopropyl unoprostone for retinitis pigmentosa : microperimetric results of phase 2 clinical study. Ophthalmology and Therapy 2012.

- 3) Nishimura T, Machida S, Harada T, Kurosaka D. Retinal ganglion cell function after repeated intravitreal injections of ranibizumab in patients with age-related macular degeneration. Clin Ophthalmol. 6: 1073-1082, 2012.
- 4) Ohnami H, Nagai N, Machida S, Kumasaka Y, Wakusawa R, Ishikawa Y, Sonoda H, Sato Y, Abe T. Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes. Retina 32: 1204-1213, 2012.
- 5) Machida S, Tamada K, Nishimura T, Harada T, Kurosaka D. Macular function evaluated by focal macular electroretinogram after reduced fluence photodynamic therapy in eyes with polypoidal choroidal vasculopathy. Doc Ophthalmol. 124: 91-98, 2012.

2. 学会発表

- 1) Machida S, Nishimura T, Kondo M, Terasaki H, Yokoyama D, Kurosaka D. Pharmacological dissection of cone ERGs of Pro347Leu rhodopsin transgenic rabbits. 50th International Society of Clinical Electrophysiology symposium, Valencia, Spain, 2012.
- 2) Nishimura T, Machida S, Harada T, Kurosaka D. Retinal ganglion cell function after repeated intravitreal injections of ranibizumab in patients with age-related macular degeneration. 50th International Society of Clinical Electrophysiology symposium, Valencia, Spain, 2012.
- 3) Nishimura T, Machida S, Kondo M, Terasaki H, Yokoyama D, Kurosaka D. Enhancement of ON-bipolar cell response of cone ERGs in rabbits with Pro347Leu rhodopsin mutation. ISCEV@ARVO, Fort Lauderdale, Florida, 2012.
- 4) Kaneko M, Machida S, Sugawara T, Otaka K, Kurosaka D. Alternation of photopic negative response of multifocal electroretinogram in patients with optic nerve atrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, Florida, 2012.

- 5) Imamura Y, Hashizume K, Fujiwara T, Machida S, Ishida M, Kurosaka D. Choroidal thickness in eyes with recurrent Vogt-Koyanagi-Harada disease. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, Florida, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

黄斑ジストロフィー患者の表現系と遺伝子変異の関連の探索

研究分担者 上野真治
名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学 助教

研究要旨： 本研究において昨年度に引き続き当研究室では、DNA解析を行うために遺伝性網膜疾患を疑われる患者の臨床所見より遺伝性網膜疾患の分類作業を診察や検査を通して行った。

対象は、網膜色素変性、オカルト黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、その他分類不能なものとした。

これらの患者から、視力、視野等の自覚的検査、および、蛍光眼底造影、網膜電図、光断層干渉計等の他覚的検査を行い、合わせて家族歴を詳細に調査した。

この中から黄斑ジストロフィーが疑われる患者、合計3検体の採血を行なった。

A. 研究目的

遺伝性網膜疾患を疑われる患者のなかにはいまだに臨床病態と遺伝学的な原因が明らかにされていないものが多数ある。

我々は、これらの疾患の表現型—遺伝子型の関連を明確にする目的で、エクソーム解析に必要な患者の臨床診断を行い、表現系を明確するという作業を行った。

B. 研究方法

当院眼科外来を受診した、各種遺伝性網膜疾患、（網膜色素変性、オカルト黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、その他分類不能の網膜ジストロフィーを対象とした。

各症例の発症の経過を詳しく調べる他に、健常者を含めた定期的な眼科ルーチン検査（視力、視野検査等）、電気生理学的検査（全視野網膜電図、局所網膜電図）、画像診断（蛍光眼底造影、光干渉断層計）などを行い、眼科検査の面から疾患な病態把握を行った。

インフォームドコンセントの元に、患者およびその健常家族から全血採血を行った

（倫理面への配慮）

採取した血液は連結可能匿名化して東京医療センターに郵送した。

C. 研究結果

罹患者およびその家族を含めて、オカルト黄斑ジストロフィー3例（今までに送付したものを含めると8例）について臨床的に診断し、採血を行った。

現在解析中であるが、2名より既に報告のあったRP1L1遺伝子の異常が見つかった。

D. 考察

オカルト黄斑ジストロフィーに関してすでに報告されたRP1L1遺伝子の異常が検出されたものが2名よりみられたが、それ以外に原因によるオカルト黄斑ジストロフィーも存在すると考えられ、この疾患はいくつかの遺伝子が原因になっていることが推測された

E. 結論

オカルト黄斑ジストロフィーの患者について臨床検査を行い、DNA採血を行った。すでに方向されたRP1L1遺伝子の異常も見つかったが、検出されないものもあり、今後のDNA解析およびさらなる家系調査により、新規の原因遺伝子が発見される可能性がある。

F. 健康危険情報

該当する危険 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe S, Sanuki R, Ueno S, Koyasu T, Hasegawa T, Furukawa T. Tropisms of AAV for subretinal delivery to the neonatal mouse retina and its application for in vivo rescue of developmental photoreceptor disorders. PLoS One. 2013; 8(1): e54146. Epub 2013 Jan 15.
- 2) Iwata E, Ueno S, Ishikawa K, Ito Y, Uetani R, Piao CH, Kondo M, Terasaki H. Focal macular electroretinograms after intravitreal injections of bevacizumab for age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Jun 28; 53(7): 4185-90
- 3) Omori Y, Araki F, Chaya T, Kajimura N, Irie S, Terada K, Muranishi Y, Tsujii T, Ueno S, Koyasu T, Tamaki Y, Kondo M, Amano S, Furukawa T. Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. J Neurosci. 2012 May 2;32(18): 6126-37

2. 学会発表

- 1) 上野真治. 腫瘍随伴網膜症における抗 TRPM1 自己抗体の双極細胞機能障害の作用機序. 第116回日本眼科学会総会, 東京国際フォーラム. 2012.4.6
- 2) 上野真治. 電気生理学的手法を用いた分子生物学的研究「腫瘍随伴網膜症におけるon型双極細胞に対する自己抗体とその作用機序」.第60回日本臨床視覚電気生理学会.ミッドランドホール.シンポジウム. 2012.10.6
- 3) 上野真治. AIRはあるか? 「腫瘍随伴網膜症におけるon型双極細胞に対する自己抗体とその作用機序」.第45回日本眼炎症学会. 京都国際会議場. シンポジウム2. 2011.7.9
- 4) 上野真治.この疾患にことERG・VEPを「網膜変性・錐体ジストロフィ」.日本眼科学会総会.東京国際フォーラム.教育セミナー. 2011.5.14

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし