

第 108 回 日本眼科学会総会 宿題報告IV

眼科検査診断法

個別化医療の時代にむけての遺伝子診断

真島 行彦

慶應義塾大学医学部眼科学教室

共同研究者

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

緑内障遺伝子解析研究会

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

要 約

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A Review

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

Yukihiko Mashima

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

Abstract

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

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

Clinical DNA diagnoses are divided into those for

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I はじめに

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

能になり、その人に応じた予防、治療が行われる個別化医療への道が開ける。

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

II 新たな遺伝子診断技術の臨床応用

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

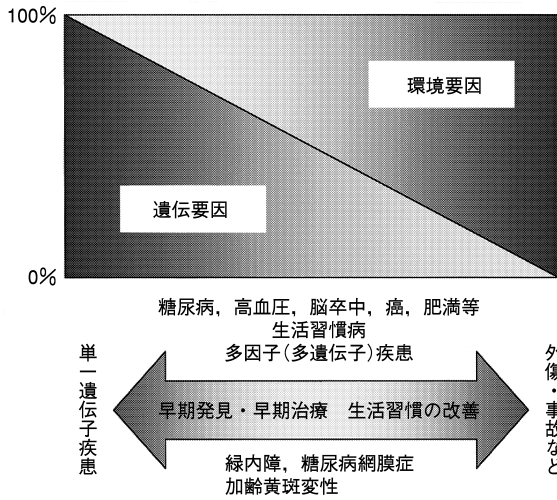


図 1 疾患の発症に関連する遺伝的要因と環境的要因との関係。

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

した後、血液を採取し、DNA を抽出した。

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

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

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

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

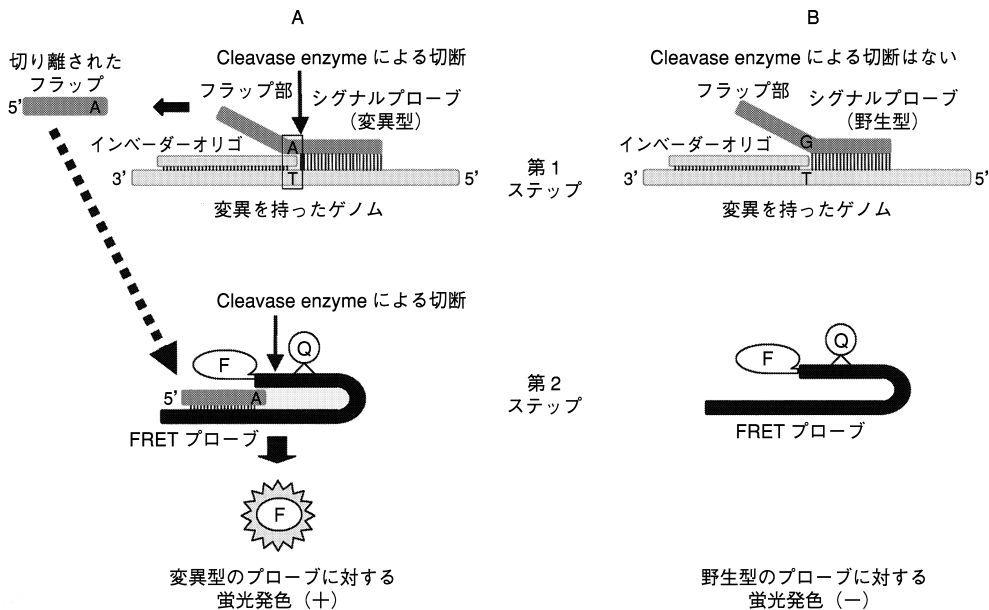


図 2 インベーター法の原理のシェーマ。

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

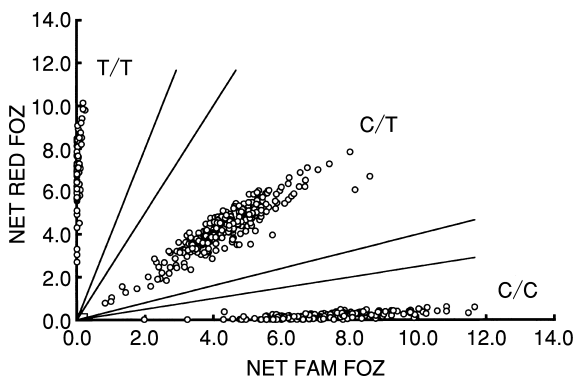


図 3 インベーター法による 300 検体の genotyping. ホモステイン代謝酵素である MTHFR 遺伝子多型 (677 C>T) の genotyping. T/T, C/T, C/C の 3 つの型に分けられる。

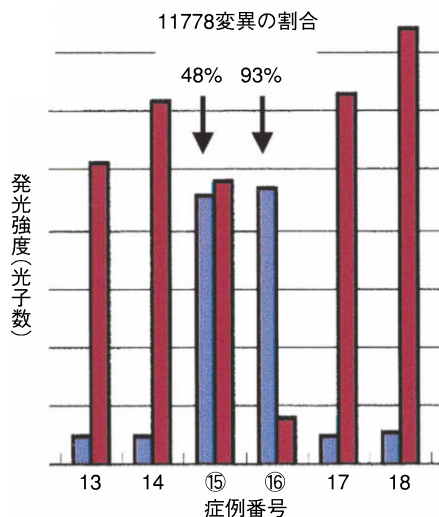


図 4 インベーター法によるミトコンドリア DNA の G11778A 変異ヘテロプラスミー定量. 症例 15, 16 は G11778A 変異をそれぞれ 48%, 93% 持つ. 他の症例は 100% 野生型 (G11778) を示す.

■ : G11778 (野生型), ■ : A11778 (変異型)

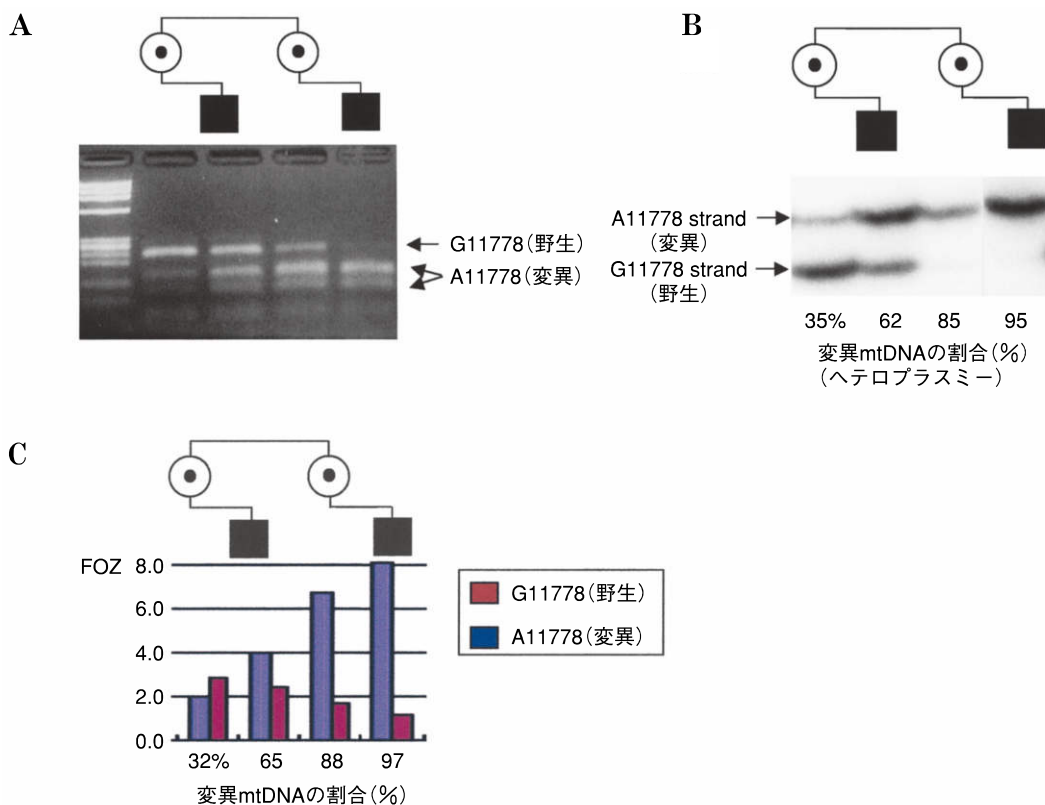


図 5 レーベル病におけるミトコンドリア DNA の G 11778 A 変異の遺伝子診断.

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

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

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

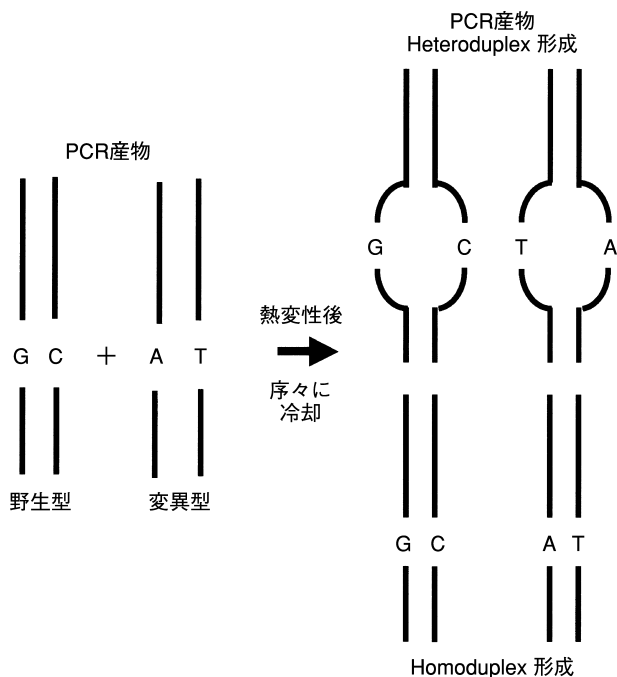


図 6 WAVE® 核酸フラグメント解析のシエマ。

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

4). ミトコンドリア DNA 変異のヘテロプラスミー定量法としてこれまで幾つかの報告があるが、一般的には PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法または PCR-制限酵素アッセイ法が用いられている⁵⁾。しかしながら、PCR 法によるヘテロ二本鎖 (heteroduplex) 形成の問題もあり、定性的である (図 5 A)。ヘテロプラスミーを正確に定量するために、我々は以前に PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) 法を開発したが⁶⁾、放射性物質を使用しており、得られた画像をデンストメトリーなどでさらに解析する必要がある (図 5 B)。従来一般的な方法である PCR-RFLP 法は、DNA 作製後結果を得るまで約 5 時間かかるのに比べ、Invader 法では 30 分程度で同時に定量まで可能であり、臨床的には簡単、正確、安価な方法である (図 5 C)。今後、レーベル病に限らず、ミトコンドリア病のヘテロプラスミーの定量には本方法が主流になると思われる。

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

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

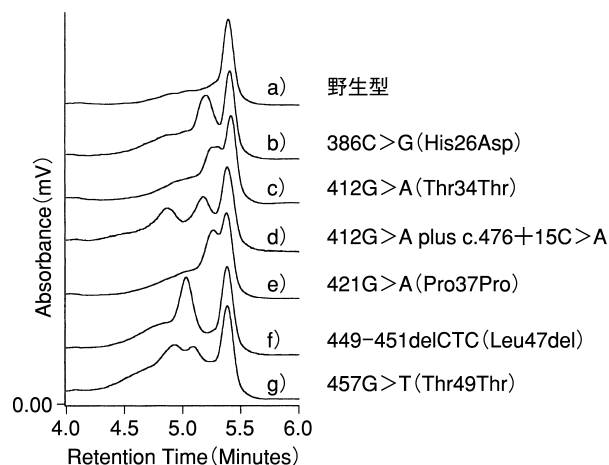


図 7 熱変性 high performance liquid chromatography (HPLC) 法による optineurin 遺伝子 Exon 4 領域の解析。

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

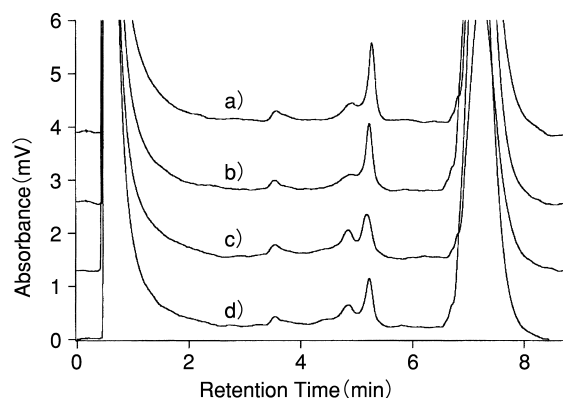


図 8 熱変性 HPLC 法による optineulin 遺伝子 Exon 16 領域の解析。

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

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

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

表 1 Optineurin 遺伝子変異

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

POAG：原発開放隅角緑内障，NTG：正常眼圧緑内障

表 2 Myocilin 遺伝子変異

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

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

表 1 に optineurin 遺伝子解析結果を示す。433 家系の開放隅角緑内障患者のうち，1 家系 (0.25%) にのみ変異が検出され (His 26 Asp)，疾患遺伝子としては非常に稀な遺伝子である¹³⁾。一方，myocilin 遺伝子であるが，171 家系の原発開放隅角緑内障 (POAG) のうち，5 家系 (3%) に 4 種類の変異 (Ile360Asn 変異，Ala363Thr 変異，Phe369 Leu 変異，Thr448Pro 変異) が検出された (表 2)¹²⁾。いずれも日本人特有の変異であったが，今回，新たな変異として，Phe369Leu 変異が確認された。

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

III 単一遺伝子疾患における遺伝子診断の臨床的意義

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

1. 遺伝子変異型に基づく新たな臨床分類による疾患の整理

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

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

2. 確定診断のための遺伝子診断

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

1) レーベル病と網膜色素変性の合併家系¹⁹⁾

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

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

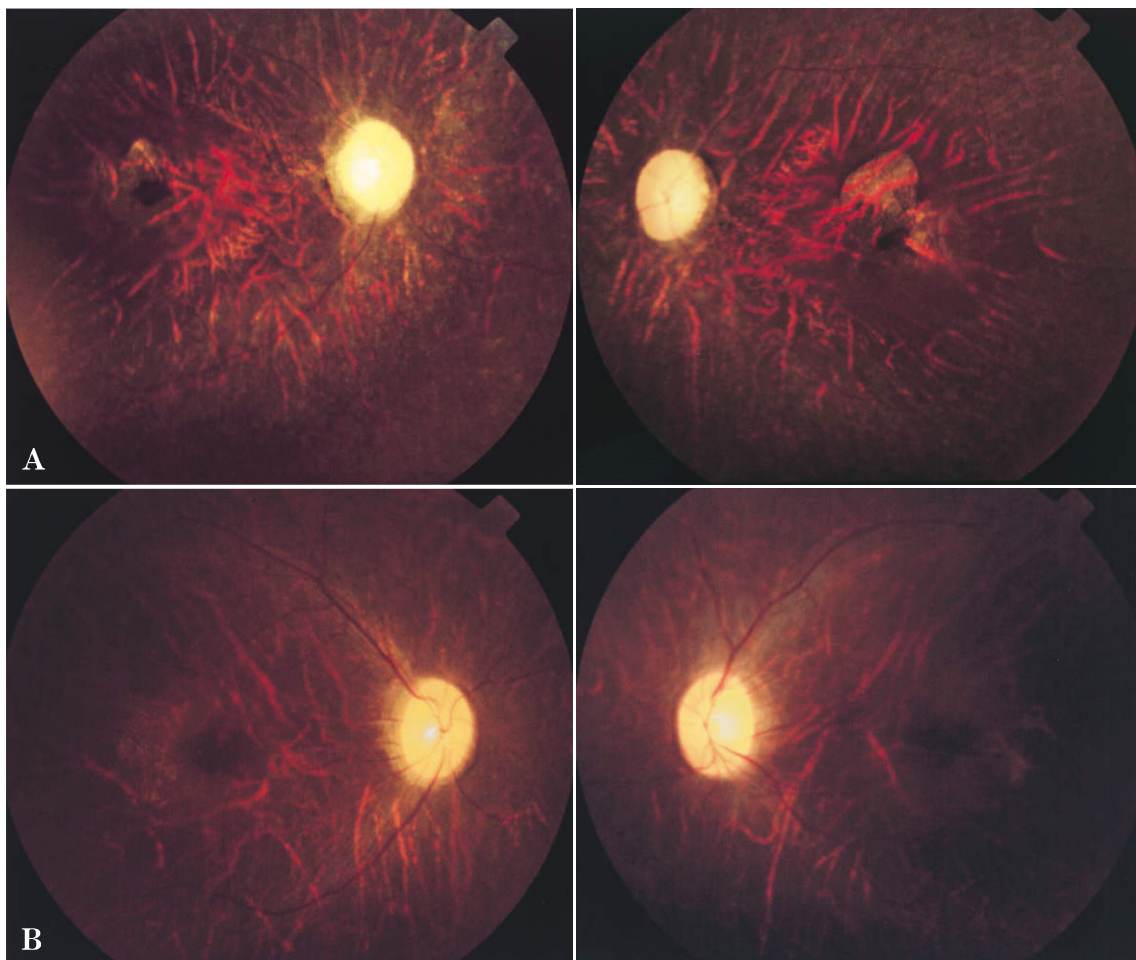


図 9 レーベル病と網膜色素変性を合併した症例の眼底写真(初診時).
A: 発端者 14 歳男児, B: 弟 12 歳男児. 兄は視神経萎縮と網膜色素上皮の萎縮が強い.

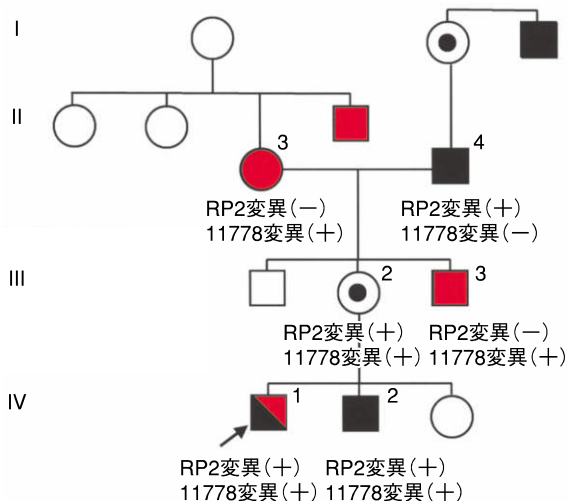


図 10 レーベル病と網膜色素変性を合併した症例の家系図.

PR 2 は X 染色体伴性網膜色素変性の原因遺伝子, 11778 変異はレーベル病を生じるミトコンドリア DNA 変異. 矢印が発端者を示す. 発端者とその弟はともに RP 2 遺伝子変異と 11778 変異を持つが, 発端者のみにレーベル病を発症した. □: 男性, ○: 女性, ⊙: 保因者

■: X 染色体伴性網膜色素変性, ■: レーベル病

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

本症例では兄弟で網膜色素変性の臨床所見にかなりの

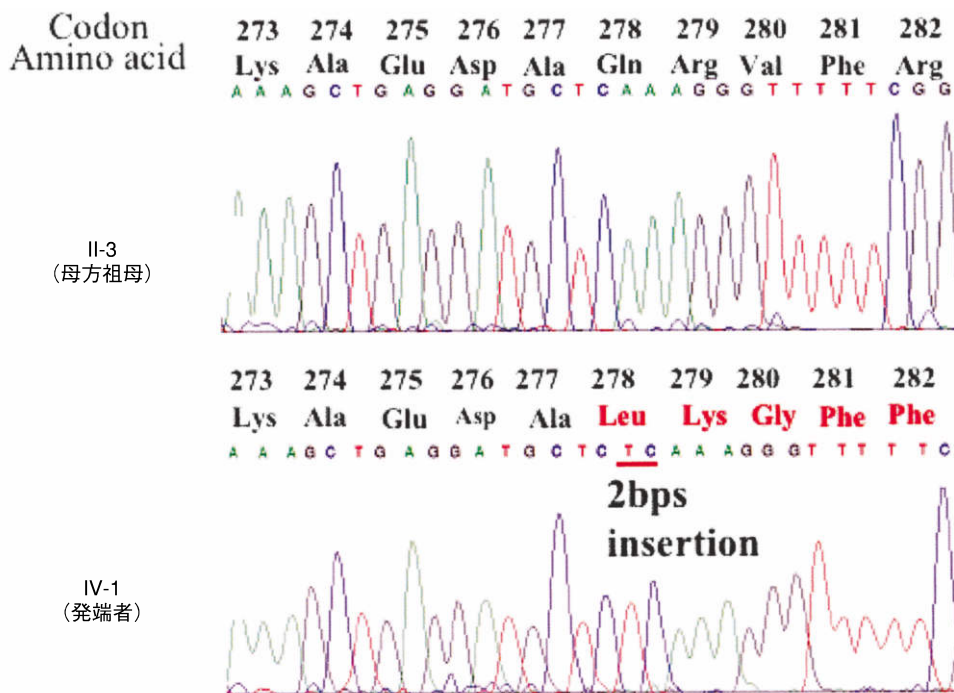


図 11 X 染色体伴性網膜色素変性家系の RP2 遺伝子解析結果

発端者はコドン 278 に 2 塩基(TC)挿入があり、その結果、それ以降のアミノ酸翻訳にフレームシフトが生じた。

差がみられたが、家族歴を参考に遺伝子診断することにより、疾患の背景を明らかにすることが可能である。

2) 帯状疱疹による両眼性視神経症と思われた症例

症 例：65 歳，女性。

主 訴：右眼視力低下。

現病歴：2001 年 10 月，右三叉神経第 2 枝領域の帯状疱疹および右眼の虹彩炎を発症し，近医でアシクロビル点滴治療およびステロイド点眼治療を受けた。その後も右眼の虹彩炎と高眼圧が続き，ステロイド点眼薬と眼圧降下剤の点眼薬で経過をみていた。2002 年 2 月ごろから右眼の視力低下を自覚し当科を受診した。

家族歴：特記すべきことなし。

初診時所見：視力は右眼 0.01(0.02×+1.00cyl-0.75 Ax 90°)，左眼 0.7(1.2×+1.25cyl-0.87 Ax 100°)であった。瞳孔反応は，右眼の直接対光反射は遅鈍，左眼の直接対光反射は迅速で，右眼にマーカス-ガン瞳孔がみられた。眼圧は右眼 22 mmHg，左眼 17 mmHg で，右眼の前房内には cells(+)，flare(+)の虹彩炎がみられた。眼底所見は，右眼は視神経乳頭耳側が軽度の蒼白化していたが，左眼の視神経乳頭には異常所見はみられなかった。Goldmann 視野検査で，右眼は中心暗点を示した。右眼の帯状疱疹ヘルペス後の視神経炎を疑い，精査，加療目的のため 3 月 28 日に入院した。

経 過：血液検査では血清 VZ-IgG は 74 index，VZ-CF は 16 倍と軽度上昇していた。髄液検査では細胞数 0，蛋白正常，PCR 法で単純ヘルペスウイルス(HSV)および水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)は検出されなかつ

た。帯状疱疹ヘルペス性視神経炎の診断でアシクロビル内服 1,500 mg(500 mg×3 回)を 10 日間とステロイドパルス療法(メチルプレドニゾロン 1,000 mg を 3 日間点滴投与)を施行したが，右眼視力の改善はみられなかった(図 13)。

初診から 4 か月後に左眼の視力低下と中心暗点が出現し，7 月 4 日再入院となった。視力は右眼 0.01(矯正不能)，左眼 0.4(0.5×+1.50cyl-1.25 Ax 90°)で，視野検査で左眼は中心暗点を呈した。眼圧は右眼 28 mmHg，左眼 24 mmHg で，前眼部は右眼前房内 cells(+)，flare(-)，左眼前房内 cells(-)，flare(-)であった。血液検査は血清 VZ-IgG は 71 index，VZ-CF は 16 倍とほぼ前回入院時と同じ値であった。髄液検査では細胞数 0，蛋白正常であった。この時点では，帯状疱疹ヘルペス後の両眼性の視神経炎と診断し，再度アシクロビル内服 1,500 mg を 15 日間とステロイドパルス療法(メチルプレドニゾロン 1,000 mg を 3 日間点滴投与)を施行したが，左眼視力は 0.04 まで低下した。蛍光眼底造影で左眼視神経乳頭からの蛍光漏出はなかった。

治療に抵抗性の予後不良な両眼性の視神経症の鑑別診断として，7 月 10 日にミトコンドリア DNA 検査を施行し，11778 番塩基の変異が検出され，レーベル病と診断した。

レーベル病は両眼性の遺伝性視神経疾患(遺伝形式は母系遺伝)で，10~20 代の男性に好発し，視力障害は急性または亜急性に出現する²⁰⁾。その発症時期に左右差はあるが両眼性である。急性期には視神経乳頭の発赤・腫

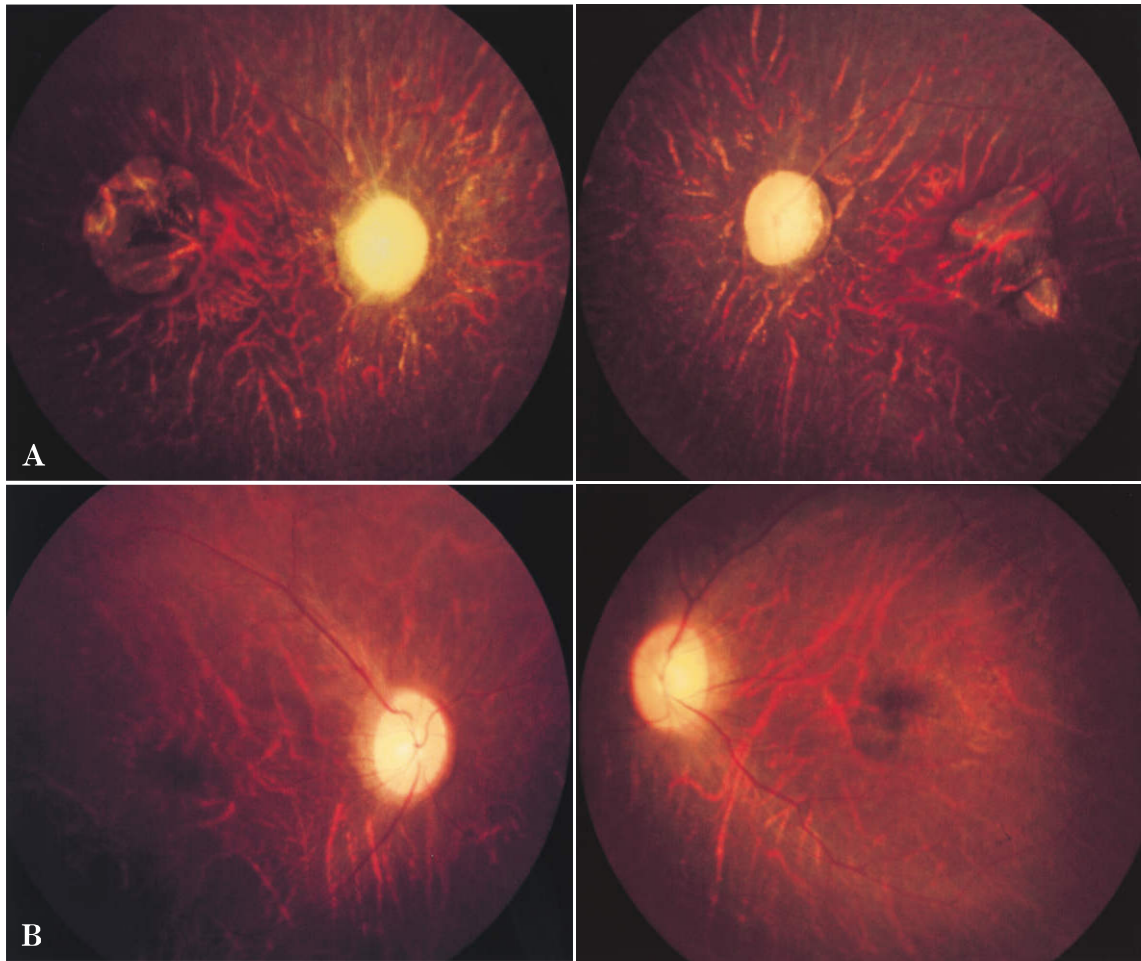


図 12 レーベル病と網膜色素変性を合併した症例の眼底写真(初診 4 年後)
 A：発端者 18 歳男児，B：弟 16 歳男児．兄は網膜色素上皮の萎縮がさらに進行したが，弟には変化があまりみられない．

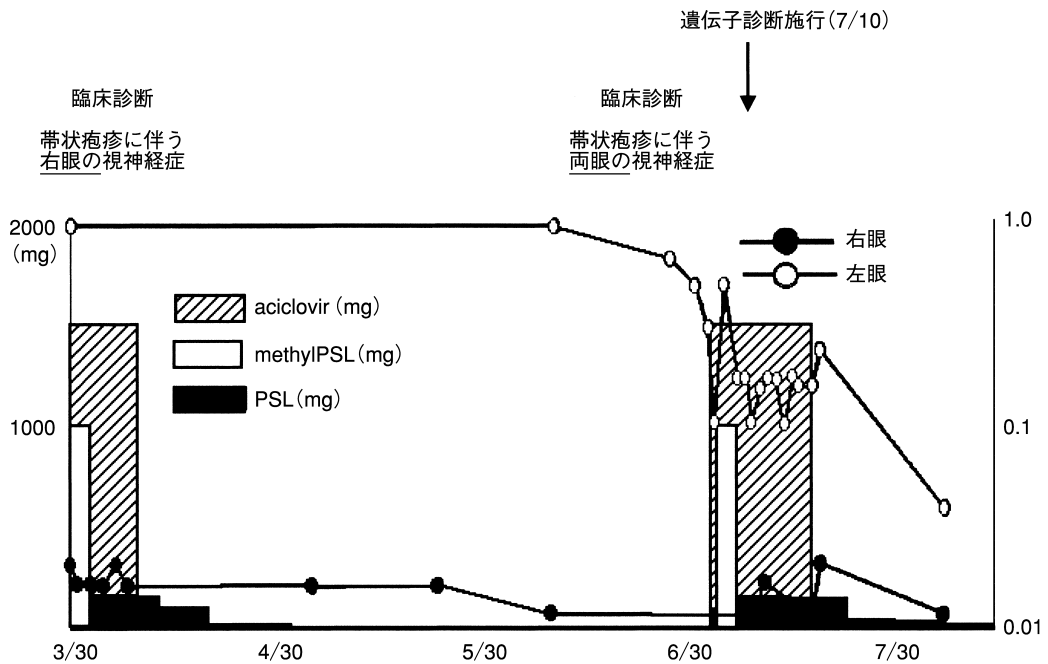


図 13 带状疱疹後に発症したレーベル病患者の臨床経過。
 右三叉神経第 2 枝領域の带状疱疹 4 か月後に右眼，8 か月後に左眼の視神経症を発症した。
 PSL：プレドニゾロン

脹, 網膜血管の蛇行, 時に網膜出血がみられ, 蛍光眼底造影上, 乳頭周囲に血管拡張性の微細血管症がみられるのが特徴とされ, また全経過を通じて蛍光色素の漏出がないことが多発性硬化症による視神経炎(乳頭炎)との極めて重要な鑑別所見である。

本症例では, 65 歳女性と高齢であり, 右三叉神経第 2 枝領域の帯状疱疹発症 4 か月後に右眼, 8 か月後に左眼の視神経症を発症した。文献的にも, 稀ではあるが帯状疱疹に伴う両眼性の視神経症の報告があり, 予後が不良と報告^{21)~23)}されている。左眼にも発症した時点でも我々は帯状疱疹後の左眼視神経炎として治療したが, ステロイドパルス療法や治療にも抵抗性であったため, 鑑別診断としてレーベル病の遺伝子診断を施行した。その結果, レーベル病と診断された症例である。本症例の経過を振り返ってみても, レーベル病を疑う特徴的な所見はなく, 治療に抵抗性の予後不良な両眼性の視神経症の鑑別診断として, 発症年齢に関係なくミトコンドリア DNA の遺伝子診断は臨床上有用である。もし, 右眼が発症した時点でレーベル病と診断できれば, 左眼発症時のステロイドパルス療法は施行されなかった。これまで当科では多くのレーベル病患者が受診しているが, 他院で診断が付かないままステロイドパルス療法を繰り返し施行されてきた症例も何例か経験している。

3. 早期診断, 早期治療のための遺伝子診断

治療法のある遺伝性疾患における遺伝子診断は, 早期診断, 早期治療のために有用である。眼科領域では緑内障がその適応と考える。前述したが, 我々は myocilin 遺伝子解析において新たな変異として, Phe369Leu 変異を見出した¹²⁾。この変異を持つ患者の発症年齢は, 一般の開放隅角緑内障患者と同じであった。この家系における遺伝子診断の意義を述べる。

発端者は 49 歳の女性で, 数年前から左眼の霞視を時々自覚し, 1998 年 2 月に当科を受診した。問診上, 家族に緑内障患者はいなかった(図 14)。初診時, 矯正視力は両眼とも 1.0 で, 眼圧は右眼 45 mmHg, 左眼 57 mmHg であった。Humphrey 視野検査(30-2)と眼底写真を図 15 に示す。ダイアモックス®内服, 2% ミケラン®点眼薬およびレスキュラ®点眼薬による治療が開始され, 両眼とも眼圧は 20 mmHg 前後となった。5 月に左眼の線維柱帯切除術が施行され, 眼圧は 10 台前半にコントロールされた。その後, 右眼はキサラタン®点眼薬と 0.5% チモプトール®点眼薬で 15 mmHg 前後にコントロールされている。

発端者は 40 歳以降の発症が考えられたことや家族歴がなかったことから, myocilin に関連する緑内障とは考えていなかったため, 当初 myocilin 遺伝子変異の検索は行わなかった。しかし, 2002 年以降は, 発症年齢や家族歴の有無にかかわらず, インフォームド・コンセントが得られた開放隅角緑内障患者を中心に myocilin

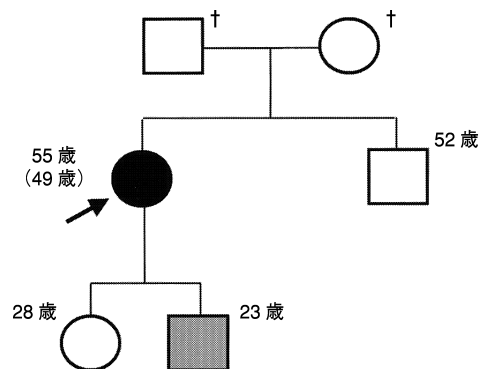


図 14 緑内障遺伝子ミオシリン Phe369Leu 変異を持つ家系図。

□: 男性, ○: 女性, ●: 開放隅角緑内障, ■: 高眼圧症。括弧内は初診時の年齢。

遺伝子解析を開始したところ, 本症例に Phe369Leu 変異が同定された。図 14 は家系図であるが, 52 歳の弟, 23 歳の長男からインフォームド・コンセントが得られ, 遺伝子検査および臨床検査を行った。その結果, 弟は正常であり, 遺伝子変異は持ってなかった。一方, 長男は遺伝子変異を持っていた。長男の眼圧は両眼とも 20~22 mmHg を変動しており, 視神経乳頭には陥凹がみられた(C/D 値は右眼 0.6, 左眼 0.8)(図 16)。静的視野検査では異常所見はみられなかった。現在は無治療で経過をみているが, 将来視神経障害が進行することは確実なため, 患者と相談の上治療開始の時期を検討している。長男の場合は自覚症状が全くないため, 遺伝子診断により早期診断が可能になった症例であった。早期診断・早期治療を開始することで, 母親のように強い視機能障害を来すリスクはなくなる。

IV 多遺伝子(多因子)疾患の感受性遺伝子解明

ゲノムプロジェクトの成果により, 多因子疾患である高血圧, 糖尿病, 虚血性心疾患など common disease としての生活習慣病の疾患感受性遺伝子の解明が可能になった²⁴⁾。単一遺伝子疾患との違いは, 対立遺伝子の浸透率の違いで, 発症リスクは数倍程度にすぎず, また一般に観察されるありふれた遺伝的多型がターゲットになる。すなわち, 疾患発症に対するリスク診断として意義がある¹⁾。今回, 我々は多因子疾患であるレーベル病と緑内障を対象に危険因子の検索を行った。

1. レーベル病

レーベル病は, 主として 10~20 代にかけて両眼性に急性あるいは亜急性の視力低下で発症し, 通常 1 年以内に高度の視神経萎縮に至る予後不良の遺伝性疾患である²⁰⁾。レーベル病は, 発症年齢, 視力予後, 性差など臨床経過が多彩である。レーベル病発症にはミトコンドリア DNA 変異は必須であるが, 発症にはその他二次的な

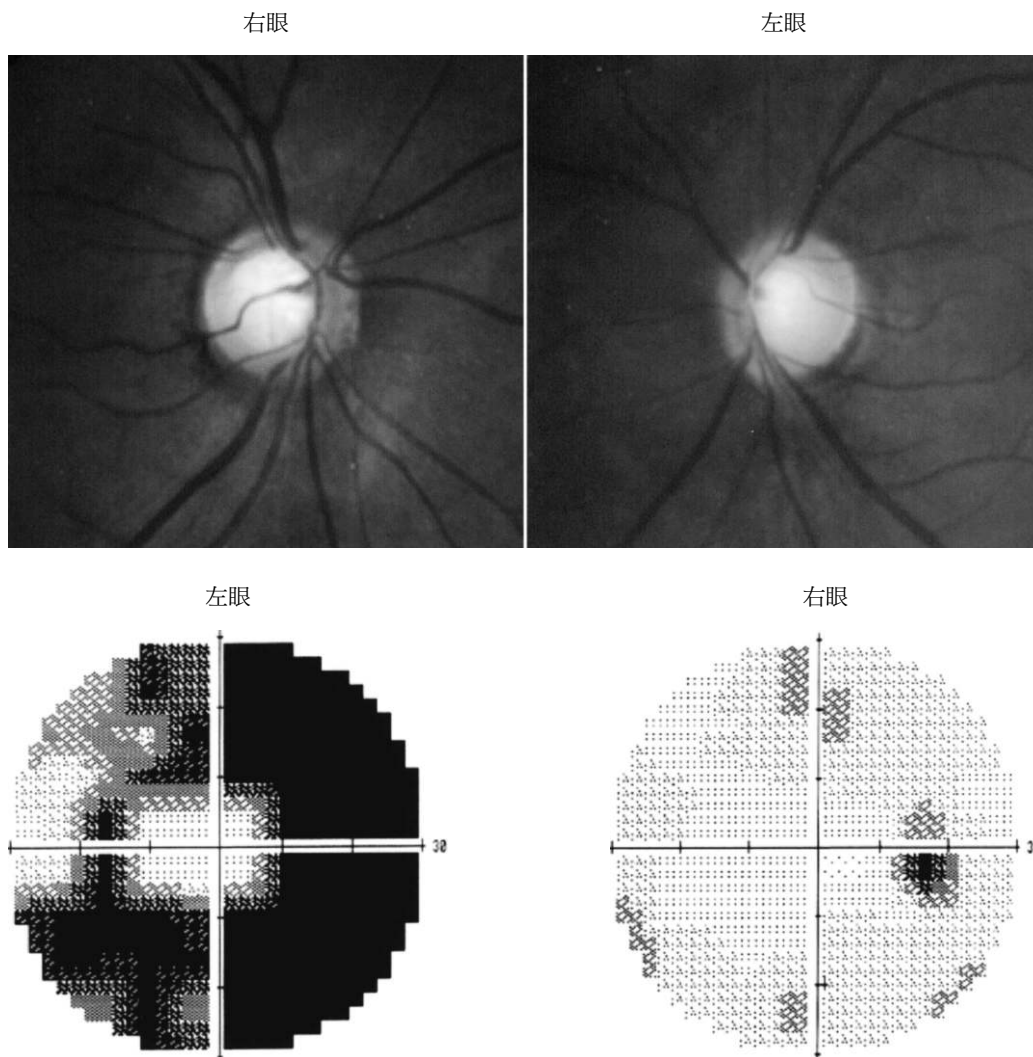


図 15 ミオシリン Phe369Leu 変異を持つ発端者の初診時の視神経乳頭写真(上段)と Humphrey 静的視野(下段)

因子, すなわち環境因子や遺伝因子が関与しているとされている(図 17)²⁵⁾. 遺伝因子として他のミトコンドリア DNA 変異(いわゆる secondary mutations)や X 染色体上の遺伝子の関与が報告されているが, 確定したものはなく未だ不明である. 一方, 動物実験や *in vitro* の実験から酸化ストレス(SOD²⁶⁾, 8-OHdG²⁷⁾, アポトーシス²⁸⁾²⁹⁾に関連する核 DNA 変異の影響が考えられている. 今回, レーベル病患者において, 酸化ストレス, アポトーシスに関連する遺伝子多型と多彩な臨床所見のうち, 発症年齢および最終視力との関連を検討した.

1) 対象

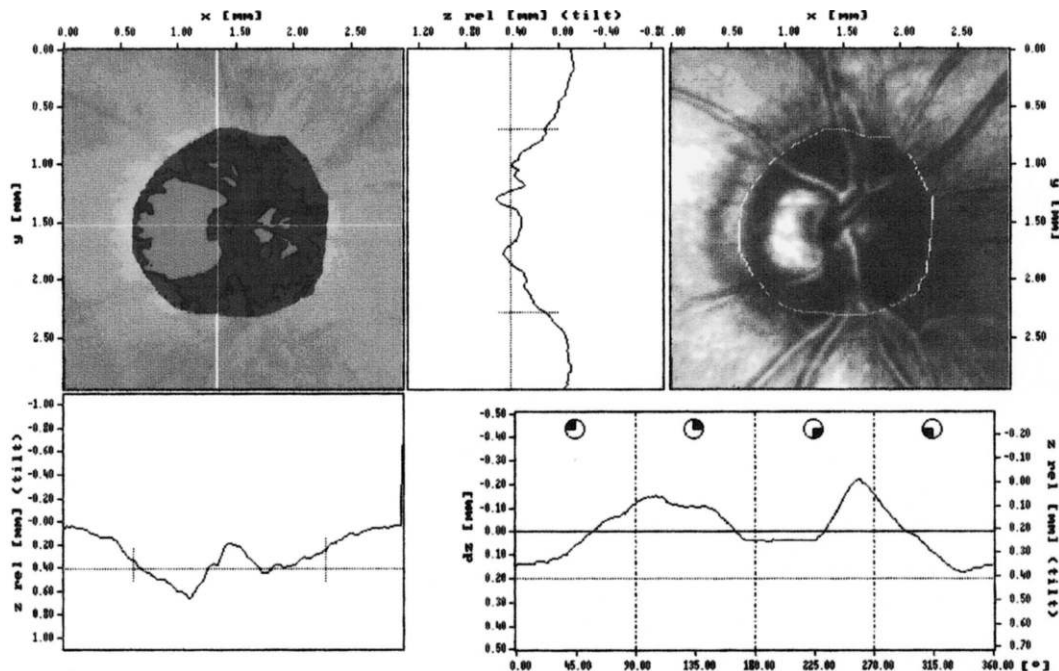
11778 変異を有するレーベル病患者 87 例(男性 79 例, 女性 8 例)を対象とした. 発症年齢は 3~65 (平均 25.0±13.0)歳で, 10 代をピークとして 30 代までが 8 割以上を占めていた(図 18). 最終視力として視力の良い方の眼の最終視力を解析対象とし(視力検査が施行できなかった 1 例を除く), 分布を図 19 に示した. 0.1 未満の症

例が 8 割以上であったが, 中には 1.0 まで回復する場合もあり, 発症年齢が低いほど視力が回復しやすい傾向があった.

2) 方法

酸化ストレスに関連する遺伝子多型として, *SOD2*(Val 16Ala), *GSTT1*(positive or null), *GSTM1*(positive or null), *EPHX1*(Tyr113His と His138Arg), *NQO1*(Pro187Ser), p22*PHOX*(His72Tyr), *NOS3*(-786 T>C と Glu298Asp), アポトーシスに関連する遺伝子多型として *TP53*(Arg72Pro)および *CD95*(-670 A>G), また網膜特異的アミノキシダーゼ *AOC2*(-81 A>G)の遺伝子多型を検討した. これらの遺伝子多型の検出には PCR-RFLP 法を用い, 各遺伝子型とレーベル病患者の発症年齢および最終視力[logarithmal of minimum angle of resolution(log MAR)視力に換算]との関連を解析した. 統計学的解析には Mann-Whitney の U 検定を用い, 有意水準は 5% 未満とした.

右眼



左眼

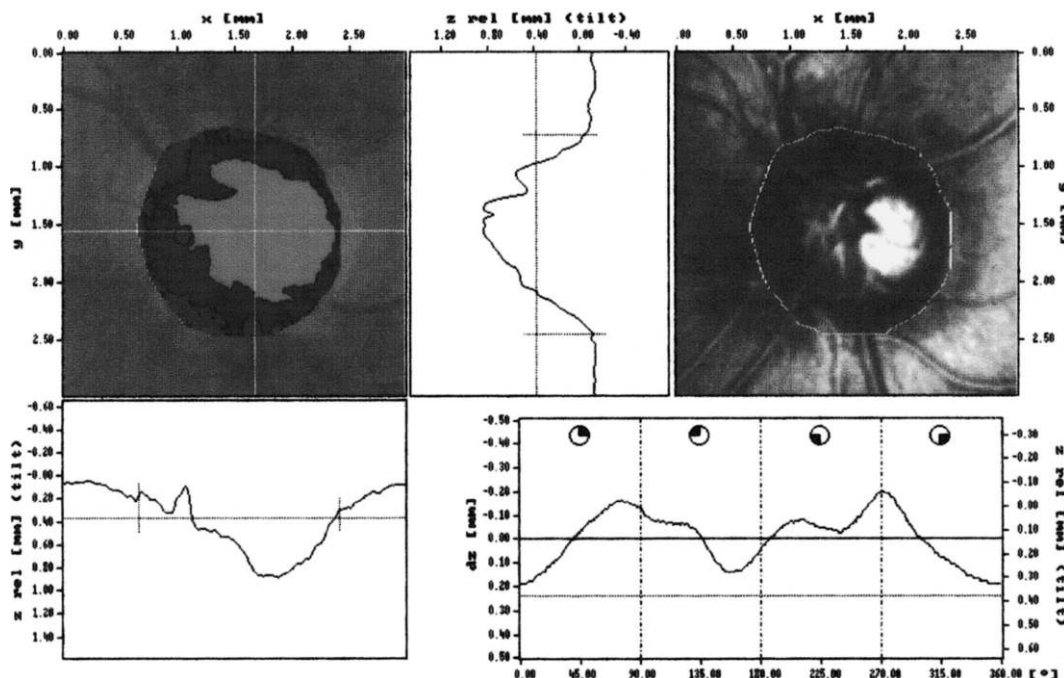


図 16 ミオシリン Phe 369 Leu 変異を持つ長男(高眼圧症)の Heidelberg Retina Tomography(HTR)による視神経乳頭解析.

Disk Area(右眼 2.199 mm², 左眼 2,534 mm²), Cup Area(0.568 mm², 1.142 mm²), Cup/Disk Area Ratio(0.258, 0.451), Rim Area(1.632 mm², 1.392 mm²), Cup Volume(0.061 cmm, 0.263 cmm), Rim Volume(0.276 cmm, 0.278 cmm), Mean Cup Depth(0.138 mm, 0.291 mm), Maximum Cup Depth(0.363 mm, 0.745 mm), Cup Shape Measure(-0.114, -0.133), Height Variation Contour(0.394 mm, 0.390 mm), Classification(-1.70, -1.40).

3) 結果

12 種類の遺伝子多型と発症年齢および最終視力との関連において、統計学的に有意差がみられたのは、TP53(Arg72Pro)多型と発症年齢、および EPHX1(Tyr

113His)多型と発症年齢であった。TP53Arg/Arg 型の発症年齢は 20.5±10.5 歳と、それ以外(Arg/Pro 型および Pro/Pro 型)の発症年齢 28.1±13.8 歳より有意に低く(p=0.007)、また、EPHX1His/His 型の発症年齢

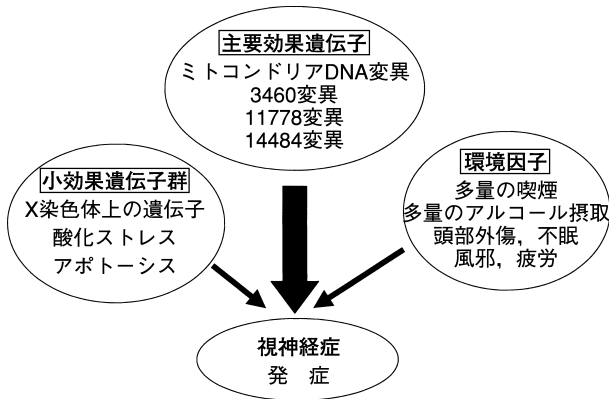


図 17 レーベル病の発症モデルのシェーマ。

レーベル病の発症にはミトコンドリア DNA 変異の他に、核遺伝子変異や環境因子が影響すると考えられている。

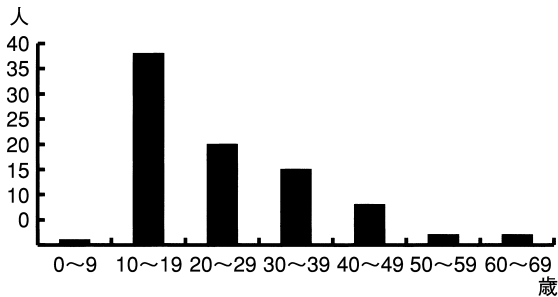


図 18 レーベル病患者 87 名の発症年齢分布。

平均発症年齢は 25.1 ± 13.0 (平均値 \pm 標準偏差) 歳であった。

は 21.9 ± 11.3 歳と、それ以外 (Tyr/Tyr 型および Tyr/His 型) の発症年齢 27.9 ± 13.9 歳より有意に低かった ($p=0.026$)。次に、これら 2 つの多型を組み合わせ二元配置分散分析と Sceffé 法を行ったところ、*TP53* Arg/Arg 型かつ *EPHX1* His/His 型を持つ患者 (A 群) の発症年齢は 17.5 ± 9.1 歳、*TP53* Arg/Arg 以外の型、かつ *EPHX1* His/His 以外の型を持つ患者 (C 群) の発症年齢は 29.8 ± 15.1 、それ以外の型を持つ患者 (B 群) の発症年齢は 25.3 ± 11.3 歳であった (図 20)。A 群は C 群より有意に発症年齢が低く ($p=0.011$)、*TP53* (Arg 72 Pro) 多型と *EPHX1* (Tyr113His) 多型に相加作用があった。今回調べた遺伝子多型と最終視力に関連はなかった。

4) 考按

レーベル病は明らかな炎症所見を示さず網膜神経節細胞層や視神経が変性し、乳頭黄斑線維束の萎縮により多くの症例で中心暗点と視力低下を来す。この病態に関しては未だ明らかではないが、活性酸素種やアポトーシスが関与することが示唆されている²⁵⁾。Qi ら²⁶⁾はマウスを用いた実験で活性酸素種がレーベル病の病因の鍵となることを指摘した。また、ミトコンドリア DNA の 11778 変異により電子伝達系酵素複合体 I (NADH 脱水素酵

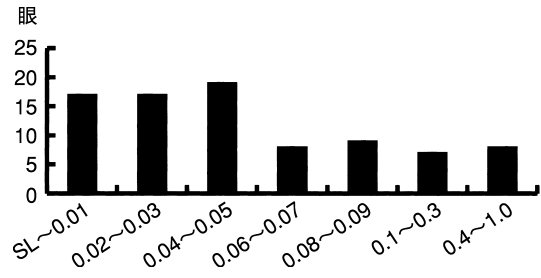


図 19 レーベル病患者 87 名の最終視力分布。両眼で良い方の視力を採用した。

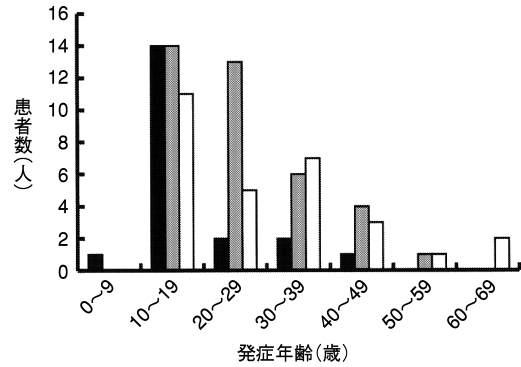


図 20 レーベル病患者 87 名の発症年齢分布と遺伝子多型。

■: A 群 (*TP53* Arg/Aeg 型かつ *EPHX1* His/His 型を持つ患者で平均発症年齢は 17.5 ± 9.1 歳), □: B 群 (A 群, C 群以外の型を持つ患者で発症年齢は 25.3 ± 11.3 歳), □: C 群 (*TP53* Arg/Arg 以外の型かつ *EPHX1* His/His 以外の型を持つ患者で平均発症年齢は 29.8 ± 15.1 歳)

素)の活性が低下し、細胞の最大呼吸率が 20~28% 減少するため³⁰⁾、レーベル病患者では活性酸素種の慢性的な蓄積もしくは産生増加が起こり³¹⁾、網膜神経節細胞などが傷害されて神経萎縮に至ることが推定されている。

p53 をコードする *TP53* は、主に細胞周期の停止やアポトーシスの誘導といった機能を持ち、DNA 損傷などのストレスにตอบสนองして p53 蛋白レベルが上昇し、標的遺伝子の活性化を誘導してアポトーシスを惹き起こすと考えられている。*TP53* に存在する Arg72Pro 多型について、Arg/Arg 型の方が Arg/Pro 型よりもアポトーシスを起こしやすく³²⁾、また、Arg72 の方がより多くミトコンドリアに局在することなどにより、Pro72 よりも数倍アポトーシスを誘導しやすいことが報告³³⁾されている。我々の結果において、Arg/Arg 型の発症年齢がそれ以外の型 (Arg/Pro 型および Pro/Pro 型) の発症年齢より有意に低かった ($p=0.007$) ことから、レーベル病患者のうち Arg/Arg 型を持つ患者は、ミトコンドリア DNA 変異による視神経障害をより助長し、発症年齢を早める可能性が示唆された。

一方の今回我々が調べたアポトーシスに関連する遺伝子 *CD95* については、サイブリッドを用いた実験から

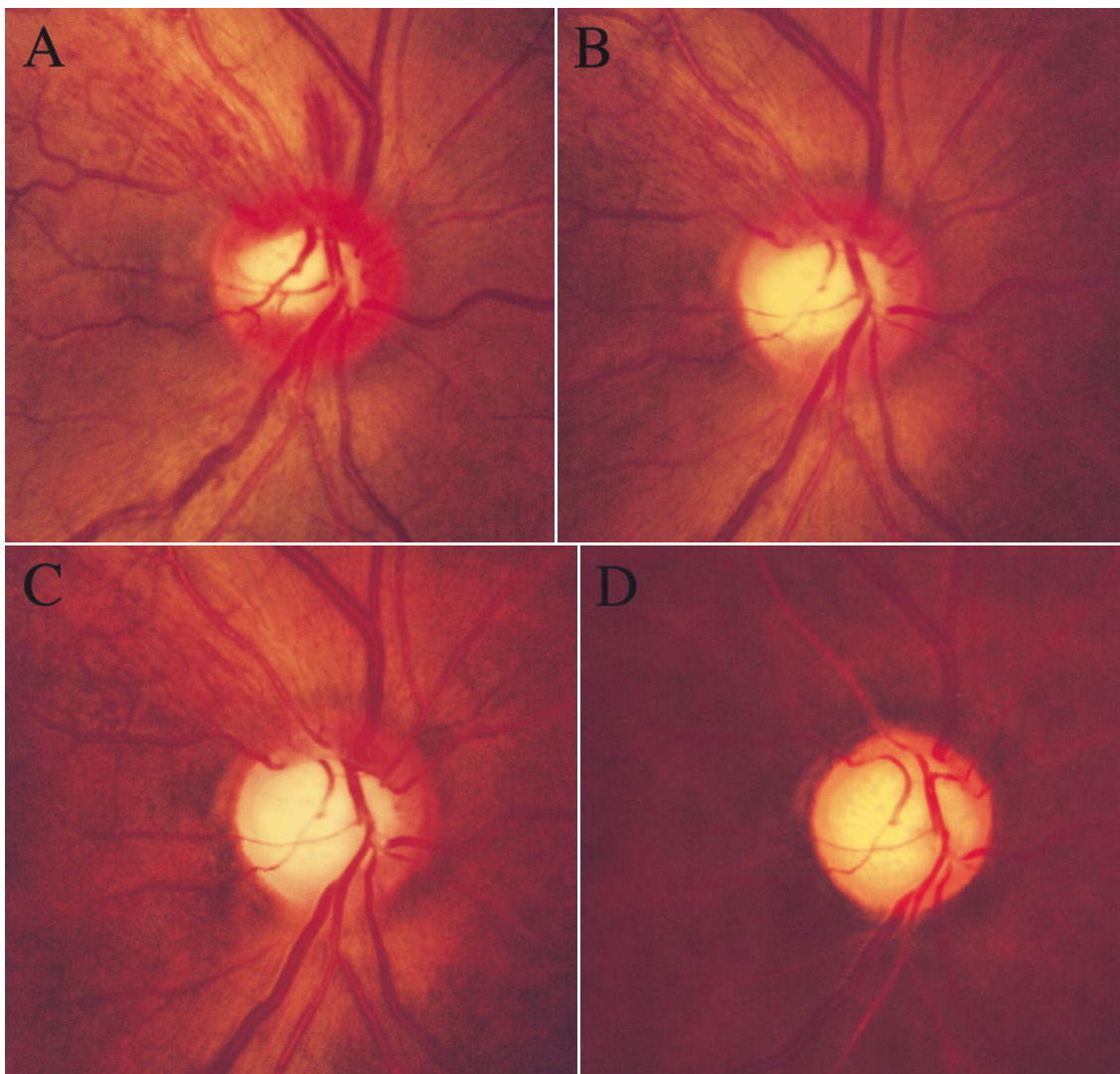


図 21 レーベル病患者の視神経乳頭所見の経過。

A：1987年7月4日急性期には線状出血がみられる。), B：1987年7月20日, C：1987年10月19日, D：1989年7月25日(2年後の萎縮期には視神経乳頭陥凹がみられる)。

Fas(*CD95*)依存性のアポトーシスが、レーベル病における細胞死の病態生理メカニズムに関与することが推定されているが²⁸⁾、-670 A>G 多型と発症年齢や最終視力に関連はなかった。

EPHX1 は喫煙などによって生じたアルキル化剤である epoxide を代謝する酵素であり³⁴⁾、酸化ストレスに対する防御作用を持ち、ニューロンを含め大抵の組織や細胞に存在する。エクソン3に Tyr113His 多型は、*in vitro* における酵素活性は野生型の活性を 100% とすると、約 40% 低下している³⁵⁾。今回の我々の結果では、エクソン3の Tyr113His 多型において His/His 型の発症年齢は Tyr/Tyr 型および Tyr/His 型の発症年齢より有意に低かった ($p=0.026$)。His アリルの人では *EPHX1* の酵素活性が低いため酸化ストレスに対する防御作用が Tyr アリルの人よりも弱く、レーベル病への進行を促進する可能性が示唆された。

また、*TP53* (Arg72Pro) 多型と *EPHX 1* (Tyr113

His) 多型の組み合わせにおいて、*TP53* Arg/Arg 型、かつ *EPHX1* His/His 型の患者の発症年齢が、それ以外の型同士の患者の発症年齢よりも有意に低かったのは興味深い結果であり、これら2つの遺伝子多型が相加的に作用してレーベル病の発症年齢を修飾している可能性が示唆された。しかしながら、これらの多型が本当にレーベル病発症に関与するかは、11778 変異のキャリアと発症者との比較が必要であり、現段階ではキャリアの症例が少ないため不明であるが、今回の我々の結果から、酸化ストレスやアポトーシスがレーベル病の発症年齢に影響を及ぼしていることが推定された。

2. 開放隅角緑内障

緑内障は多因子疾患であるが、多因子疾患の疾患感受性遺伝子を同定する方法として、候補遺伝子多型をマーカーとして、多数症例を用いて case-control 関連研究を行った²⁴⁾。対象は、POAG が 201 名(採血時の平均年齢 ± 標準偏差は 65.1 ± 12.0 歳)、正常眼圧緑内障 (NTG)

表 3 Optineurin 412 G>A(Thr 34 Thr)多型頻度

臨床型	n	アレル頻度(%)		P value	オッズ比
		G	A		
POAG	194	311(80.2)	77(19.8)	0.005	1.75(1.20-2.56)
NTG	217	358(82.5)	76(17.5)	0.043	1.50(1.03-2.19)
Control	218	382(87.6)	54(12.4)		

P value for χ^2 test.

が234名(同58.8±13.6歳), 正常人が236名(同70.6±10.9歳)の合計671名である。正常人は緑内障の発症の可能性を少なくするために意図的に高齢とした。

1) 視神経乳頭の脆弱性とミトコンドリア DNA 変異レーベル病の萎縮期では視神経乳頭の陥凹所見がこれまでに報告されてきた。図21は11778変異を持つレーベル病患者の2年間の経過における視神経乳頭写真である。萎縮期には緑内障様の視神経乳頭陥凹がみられた。我々はレーベル病患者とNTG患者において、視神経乳頭陥凹所見を他覚的に解析するために、Heidelberg Retinal Tomography(HRT)を用いて三次元的に解析した結果を2003年に報告³⁶⁾した。その結果、HRTの9個のパラメータのうち7個において両者でほとんど差がみられなかったが、陥凹の深さに関するパラメータであるMean Cup DepthとMaximum Cup Depthにおいてのみ有意にNTG患者の方が有意に陥凹が強かった(両者とも $p<0.001$)。また、緑内障判定プログラムでは(classification)73%が緑内障と判定された。このことから、ミトコンドリア DNA 変異が視神経の脆弱性に関与する可能性があること²⁵⁾、筋組織では加齢によりミトコンドリア DNA 変異が蓄積すること³⁷⁾、また常染色体優性遺伝視神経萎縮の原因遺伝子OPA1はミトコンドリア蛋白をコードし、その遺伝子多型と正常眼圧緑内障患者に有意に関連すると報告³⁸⁾されており、ミトコンドリア DNA 変異が緑内障の悪化因子であるという仮説を立てた。

今回、開放隅角緑内障187名、正常眼圧緑内障患者234名、正常人236名の合計657名を対象に、レーベル病に関連する6つのミトコンドリア DNA(G3460A(ND1), G11778A(ND4), T14484C(ND6), T9101C(AT-Pase 6)³⁹⁾, G9804A(CO XIII)⁴⁰⁾, T14498C(ND6)⁴¹⁾変異の有無、およびヘテロプラスミーの定量をInvader法で行った⁴⁾。前者3つはレーベル病として一般的な変異であるが、後者3つは稀な変異である。その結果、7症例に3種類のミトコンドリア DNA 変異(G11778A, T9101C, G9804A)と新たな2種類の変異(C9099A, T9101G)がみられた。これらの変異は正常人236名にはみられなかった。T9101C⁴²⁾、G9804A⁴³⁾の両変異は、レーベル病を発症するには比較的稀で、家族内発症が少ない変異であることから、変異としては強い障害をもたらすよりは、他の因子の影響を受けることでレーベ

ル病を発症するものと考えられる。したがって、今回の結果は、ミトコンドリア DNA 変異が直接緑内障を発症するというのではなく、ミトコンドリア DNA 変異が緑内障性視神経障害に二次的に関与している可能性を考えている。症例数が少ないが、今後は緑内障の進行の危険因子の可能性として、緑内障の発症に強く関連する他のミトコンドリア DNA 変異を解明する価値はあると思われた。

視神経線維は篩状板を境に視神経乳頭部では有髄から無髄へと変化するが、cytochrome-c oxidase 活性は視神経乳頭部の無髄神経線維において高いことが報告²⁵⁾⁴⁴⁾されている。したがって、ミトコンドリア DNA 変異が存在すると無髄神経線維部が強く障害されることが考えられる。ミトコンドリア DNA 変異を持つ緑内障患者では、ミトコンドリアの賦活剤、CoQ10などの投与が治療に有効な可能性がある。

2) Optineurin と tumor necrosis factor(TNF)- α

Optineurin 遺伝子の412G>A多型に関して、case-control 関連研究を行った結果、POAGおよびNTGの発症に強く関連していることが明らかになった(表3)。すなわち、Aを持つ人は緑内障を発症するリスクがあることを意味している(オッズ比はPOAGは1.75、NTGは1.50)。ただし、これ自体の多型が直接疾患の発症に関連するか、その生物学的な意味は不明である。おそらく、この多型と連鎖不平衡にある別の多型がoptineurinの活性変化に関連している可能性が高い。今後はその多型を明らかにする計画である。

OptineurinはTNF- α 誘導蛋白質であり、アポトーシスを阻害し、TNF- α シグナル回路を通じて視神経保護作用に関連することが提唱されている¹¹⁾。我々は、TNF- α 遺伝子プロモータの-308G>A多型⁴⁵⁾、-857C>T多型⁴⁶⁾に注目した。TNF活性はTalleleの方が高いことが報告⁴⁷⁾されている。-308G>A多型および-857C>T多型に関してcase-control関連研究を行ったが、POAG、NTGともに関連はなかった。しかしながら、-857C>T多型に関して、POAGにおいてoptineurin遺伝子の412G>A単独の場合のオッズ比1.76に比べ、-857C>T多型と組み合わせた場合にはオッズ比はさらに高くなり2.86となった(図22)。すなわち、TNF- α 遺伝子プロモータの-857Tアレルとoptineurin遺伝子の412Aアレルの両者を持つと緑内

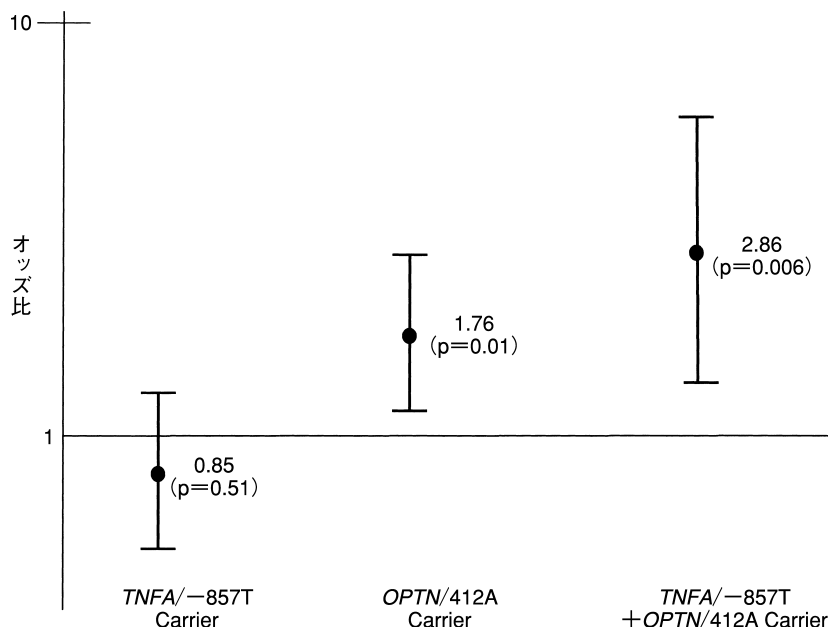


図 22 開放隅角緑内障発症の遺伝子多型オッズ比。

OPTN/412A carrier のオッズ比は 1.76 であるが、同時に TNFA/-857T carrier でもあれば、オッズ比は 2.86 と高くなる。

障発症の危険度が増すことを表している。臨床型では、TNF- α 遺伝子プロモータの-857 T を持つ患者のうち、optineurin 遺伝子の 412 A を持つ患者(modified Aulhon-Greve classification による視野障害の平均値±標準偏差は 3.2 ± 1.3) は持たない患者(2.7 ± 1.3) に比べ、視野がより進行していた($p=0.024$, Mann-Whitney U test)。

この結果は、optineurin と TNF- α が互いに直接影響して緑内障を発症、悪化させるということを示しているのではなく、危険因子のマーカーとしてこの遺伝子型を有すると、より危険度が増すという意味である。Optineurin と TNF- α が互いに生物学的な相互作用があることは証明されているが、これらの多型が持つ蛋白質の生物学的な相互作用は証明されていない。今後それが証明されれば、緑内障の発症機序が解明されると考えられる。

3) 全身疾患は緑内障の危険因子に成り得るか

眼圧が緑内障性視神経障害に対して、最も危険な因子であることはこれまでに多くの報告⁴⁸⁾がなされてきた。しかしながら、正常眼圧緑内障や開放隅角緑内障患者の末期においては、眼圧が低めにコントロールされていても視野欠損が進行する。したがって、緑内障は眼圧だけでなく、非眼圧性の因子による視神経障害も考えられてきた⁴⁹⁾。これまでの疫学的研究により、高血圧、夜間低血圧、糖尿病、喫煙等が緑内障発症と関連するとの報告もあり、全身性の血管病態が緑内障発症に関与する可能性がある(図 23)⁵⁰⁾⁵¹⁾。

我々は、全身疾患に関連することが予測される緑内障

の疾患感受性遺伝子の検出を行った。この緑内障感受性遺伝子を明らかにする新しい方法論として、候補遺伝子解析法とゲノムワイドな検索により解析する 2 つのアプローチがある。

緑内障感受性遺伝子同定するに当たり、候補遺伝子法を用いて 38 遺伝子 52 多型を case-control 関連解析で検討した。その内訳は、血管作動性物質関連(ATG, REN, ACE, CYM, CYP11B1, HMOX1, END1, NOS3), 動脈硬化関連(APOE, MTHFR), 酸化ストレス関連(SOD2, NQO1, p22phox, PON1, PON2), サイトカイン関連(TNFA, TNFR2, IL-1 α , IL-1 β , TGBF1), アポトーシス関連(TP53, CD95), 接着分子関連(SELE), 外来物質代謝酵素関連(EPHX1, GSTM1, GSTT1, GSTP1), 線溶系関連(PAI-1), 細胞外マトリックス関連(MMP2, MMP9), 加齢関係(WRN), 受容体関連(AT1, AT2, ENDRA, ENDRB, TNFRSF1A, TNFRSF1B, HTR2C, CNR1), そしてその他にストレス蛋白 HSP 70, 網膜特異的アミノキシダーゼ RAO を検討した。これらの中で緑内障と関連した遺伝子多型は、AT2, PON1, GSTT1, NOS3, EDN1 であった。

個人個人でその危険因子となる緑内障感受性遺伝子多型が異なることがわかり、今後は緑内障感受性遺伝子多型を数多く明らかにすることで、緑内障の発症機序が明らかになることが考えられる。

4) ゲノムワイドな方法による緑内障感受性遺伝子の同定

これまでに述べてきたことは、候補となる感受性遺伝

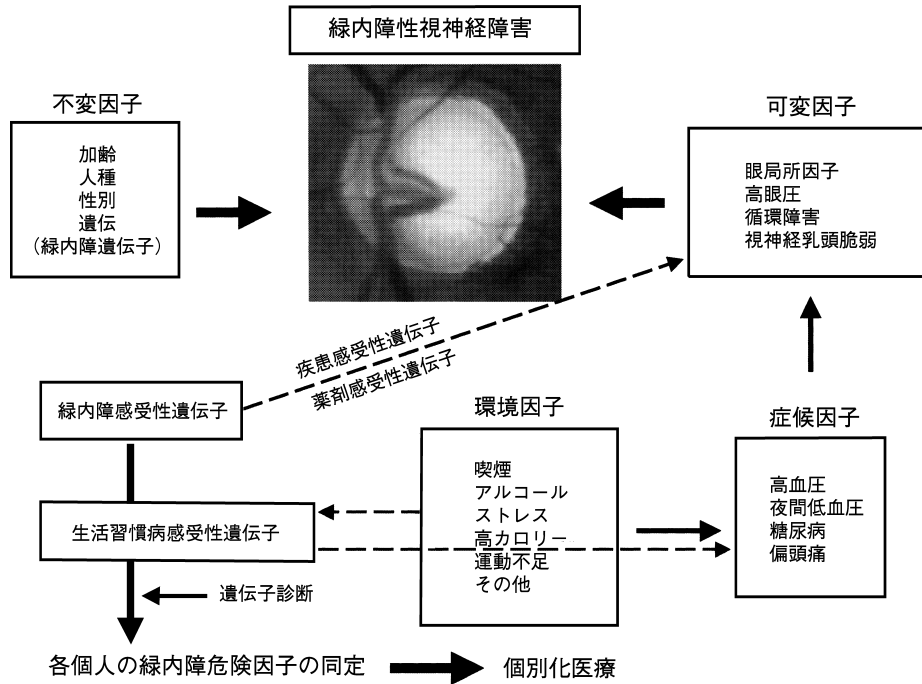


図 23 緑内障発症に関連する種々の危険因子(仮説).

不変因子(遺伝的要因)と可変因子(環境要因)の関与が考えられる。遺伝的要因には、緑内障感受性遺伝子と生活習慣病感受性遺伝子が考えられる。これらの因子は個人により異なるので、それを明らかにすれば治療に関して個別化医療へ応用が可能である。

子多型の同定であったが、今後は未知の新規な感受性遺伝子も同定してゆく必要がある。これまで外国では、ゲノムワイドな方法による緑内障感受性遺伝子の染色体上のマッピングに関する報告^{52)~54)}がされている。我々は現在企業と共同で、日本人緑内障患者における感受性遺伝子を解明するプロジェクトを進めている。

V アンジオテンシンII受容体ブロッカーの緑内障治療薬(代替医薬品)としての応用

レニン・アンジオテンシン系は強力な血管収縮作用により血圧を上昇させるが、眼局所(網膜, 毛様体)にもレニン・アンジオテンシン系が存在し⁵⁵⁾⁵⁶⁾⁵⁷⁾, 房水動態に関与すると考えられている。実際に ACE 阻害剤⁵⁸⁾やアンジオテンシンII受容体ブロッカー⁵⁹⁾の投与により眼圧が下降することが報告されており、これを支持している。眼圧下降の機序として、動物実験からは uveal flow の増大が考えられている⁶⁰⁾。

今回我々は、正常人 38 人においてアンジオテンシン II 受容体ブロッカーであるカンデサルタン 12 mg を内服させ 1 時間毎に 6 時間までと 24 時間後にそれぞれ、眼圧, 血圧(拡張期および収縮期), 脈拍数を検査した。男性 21 名, 女性 17 名であった。眼圧下降効果と 3 種類の AT1 受容体多型(1166 A>C, -521 C>T, -713 T>G)との関連を検討した。実験に当たり、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得た後、被検者からイン

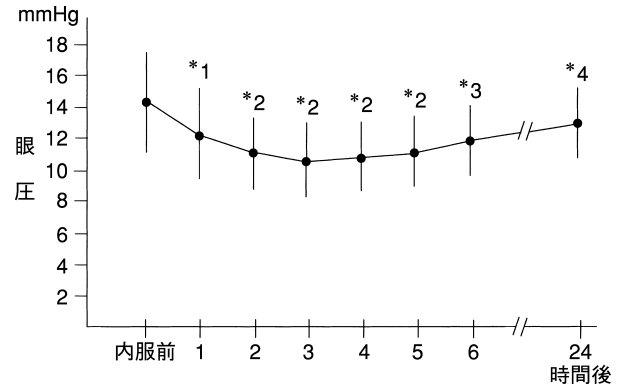


図 24 アンジオテンシンII受容体ブロッカー(カンデサルタン)内服による眼圧下降効果.

24 時間にわたり内服前と有意に眼圧が下降している。One-factor ANOVA 検定で $p < 0.001$. 内服前眼圧 14.3 ± 3.3 (平均値 ± 標準偏差) mmHg, 内服 1 時間後眼圧 12.2 ± 3.0 mmHg (*1: $p = 0.0004$, Fisher PLSD 検定), 内服 2 時間後眼圧 11.1 ± 2.5 mmHg (*2: $p < 0.0001$), 内服 3 時間後眼圧 10.6 ± 2.4 mmHg (*2: $p < 0.0001$), 内服 4 時間後眼圧 10.9 ± 2.3 mmHg (*2: $p < 0.0001$), 内服 5 時間後眼圧 11.1 ± 2.2 mmHg (*2: $p < 0.0001$), 内服 6 時間後眼圧 11.9 ± 2.2 mmHg (*3: $p = 0.0001$), 内服 24 時間後眼圧 12.9 ± 2.2 mmHg (*4: $p = 0.03$).

フォームド・コンセントを得た後、検査および採血を行った。

結果を図 24 に示す。One-factor ANOVA 検定にて、

p<0.001 で、多群間で統計学的に有意差がみられた。Fisher ptotected least significant difference(Fisher PLSD)検定で、すべての時間において内服前より有意に眼圧は低下していた(p<0.01)。眼圧下降は内服後3時間で最大となり、24時間下降効果は維持された。血圧(拡張期および収縮期)や脈拍数に有意の変化はみられなかった。図 25 は 38 名の個々の眼圧変化を示した図であるが、AT1 遺伝子多型と眼圧効果には関連はなかった。各個々により薬剤効果に差があることがわかる。

アンギオテンシンII受容体ブロッカーは高血圧でない人にはそれほど血圧下降を来さないことが報告されている。したがって、ダイアモックス®が何らかの理由で内服できず、高血圧を合併していない緑内障患者では使用できる可能性がある。現在点眼薬(オルメサルタンメドキシミル)の開発も行われている(フェーズ 2)。今回の

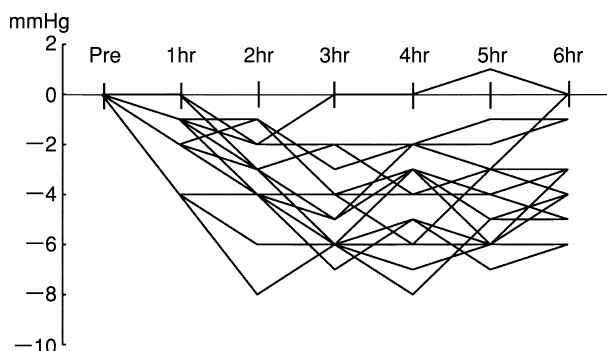


図 25 アンギオテンシンII受容体ブロッカー(カンデサルタン)内服による眼圧下降幅。38名の個々の眼圧下降幅を示す。

結果は、緑内障患者で高血圧治療薬としてアンギオテンシンII受容体ブロッカーを内服している患者の眼圧は、実際の眼圧よりも数 mmHg ほど低いことを念頭に入れておく必要があることを示唆している。問診の時にアンギオテンシン転換酵素(ACE)阻害剤やアンギオテンシンII受容体ブロッカーの内服の有無を知っておく必要がある。

VI 遺伝子変異検出パネルの作成

将来の遺伝子診療や個別化医療に備え、Invader 法を用いた緑内障遺伝子のミオシリン変異診断パネルのプロトタイプを作成した(<http://biotech.nikkeibp.co.jp/news/detail.jsp?newsid=SPC2003063023256>)。現在解析できる変異は Ile360Asn, Ala363Thr, Gly367Arg, Pro370Leu および Thr448Pro である。

今後は、緑内障発症または進行に関するリスク診断を行う感受性遺伝子多型検出パネルの作成を目指している。例えば、ある人が危険因子を持っているとして、数が多ければそれだけ発症や進行のリスクが高くなることが考えられる。図 26 は予想図であるが、持っている数によりその危険度は異なるため、将来的には多数症例を検討することにより、リスクの高い範囲を決定できると考えられる。しかしながら、緑内障発症や進行の危険度は危険因子の数だけの問題ではなく、その質(または種類)にもよるので、危険因子の質にもリスク度の順番を決定して行くことが重要と考える。

VII 遺伝子診断の今後の展望

図 27 は第 107 回日本眼科学会総会の特別講演で塚原

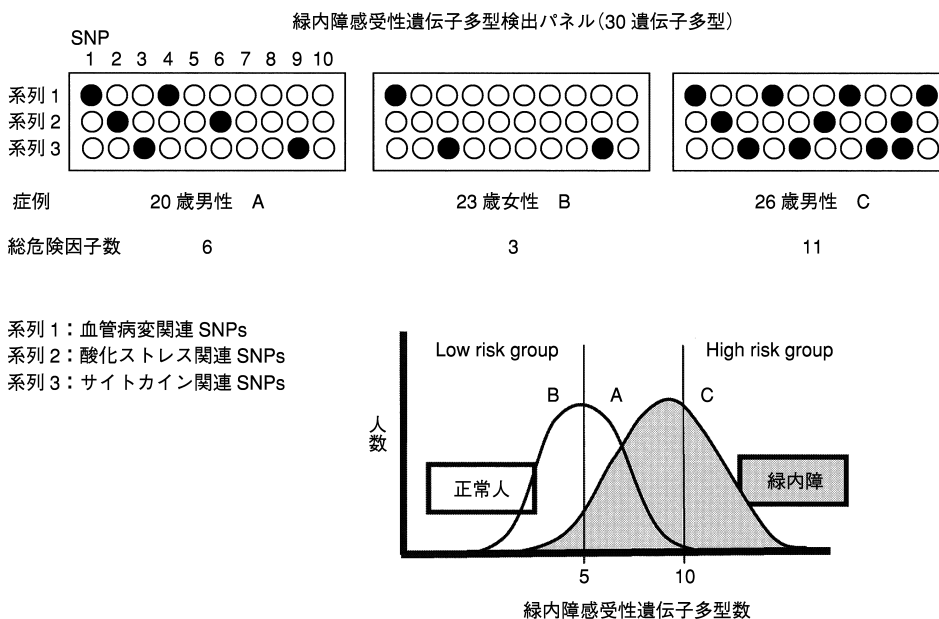


図 26 緑内障感受性遺伝子多型検出パネルと緑内障発症リスクの予想。診断パネルにより危険因子数を検出し(上段)、それに基づき危険度を推定する(下段)。

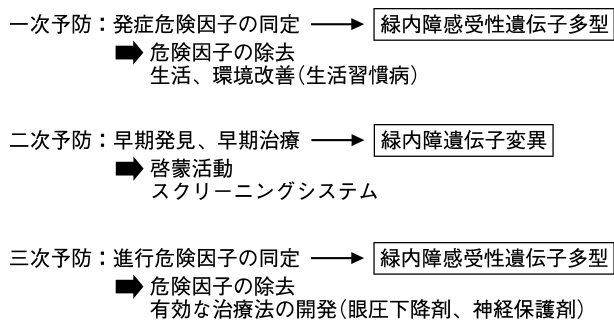


図 27 緑内障による失明予防戦略。

塚原重雄：21 世紀の緑内障診療の現状と未来。日眼会誌 107：745，2003 より改変した。各個人における危険因子としての遺伝子多型を明らかにすることで，個別化医療への道が開ける。

重雄名誉教授が述べられている「21 世紀の緑内障診療の現状と未来」を参考にゲノム医療における緑内障による失明予防戦略を作成したものである。

一次予防として，緑内障の発症に関連する危険因子が同定できれば，その因子を除去することにより発症を抑えるか，発症を遅くすることが可能となる。最近，スタチン(HMG-CoA 還元酵素阻害剤)や他のコレステロールを下げる内服薬を長期に使用することにより緑内障発症の危険を下げる事が報告⁶¹⁾された。特に，コレステロールが高い人ではより有効であった。スタチンはコレステロールを低下させるだけでなく，血管保護作用(血管内皮の NO 合成酵素の発現増加や AT1 受容体作用の抑制)が報告されている。各個人における危険因子を診断することができれば，それに応じた治療が行われる(個別化医療)。二次予防としては，早期発見，早期治療であるが，緑内障の患者はその 20% が医療機関を受診しているに過ぎないことから，積極的な啓蒙活動を行うことが重要と思われる。家族歴は高い危険因子なので，家系内に緑内障を発症している人は，緑内障遺伝子診断を行うことで，発症前にその確定診断を受けることができ，早期治療が可能となる。

三次予防としては，緑内障を発症した患者の進行を遅らせることであるが，各個人において，進行の危険因子がわかれば，それに応じた治療が行われる。例えば，エンドセリンは緑内障との関連が示唆されているが，エンドセリン関連の感受性遺伝子多型が悪化に関連するとすれば，その危険因子を持った患者はエンドセリンを抑える薬剤の投与が有効である可能性がある⁶²⁾⁶³⁾。

21 世紀のゲノム医療の時代における遺伝子診断の意義は，多因子疾患におけるリスク診断である。緑内障感受性遺伝子多型の検索は，各個人のゲノムの多様性，すなわち緑内障になりやすい体質の差や進行しやすい体質の差を検出することになり，その情報は個別化医療にむけて発症の危険性や予防，予後予測，および将来的には薬剤などの治療法の選択および新しい治療薬の開発につ

ながることが期待される。また，今回，アンギオテンシン II 受容体ブロッカーによる眼圧下降効果に関連する遺伝子多型は発見できなかったが，レニン・アンギオテンシン系多型と関連する緑内障患者はアンギオテンシン II 受容体ブロッカーが有効である可能性がある。したがって，今後は既存の内服薬でもスタチンやアンギオテンシン II 受容体ブロッカーのように，緑内障予防や治療に関連する内服薬を個別化医療の中で緑内障治療薬として使用できる可能性が考えられる。

稿を終えるに当たり，宿題報告の機会をいただきました日本眼科学会評議員各位，座長の労をお取りいただき研究の方向につきご助言を賜りました東京大学新家 眞教授に心から感謝申し上げます。

また，本研究は多くの学内外の先生方にご協力を賜りました。ここに心より感謝し御礼を申し上げます。

本研究は，文部科学省科学研究費補助金，厚生労働省科学研究費補助金，未来開拓学術研究推進事業委託研究などの研究助成を受けた。

文 献

- 1) 多因子-遺伝要因の解明と現状-。医学のあゆみ 202(10)：474-888, 2002.
- 2) Lyamichev V, Mast AL, Hall JG, Prudent JR, Kaiser MW, Takova T, et al: Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. Nat Biotechnol 17: 292-296, 1999.
- 3) Olivier M, Chuang LM, Chang MS, Chen YT, Pei D, Ranade K, et al: High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms using new biplex invader technology. Nucleic Acids Res 30: e 53, 2002.
- 4) Mashima Y, Nagano M, Funayama T, Zhang Q, Egashira T, Kudoh J, et al: Rapid quantification of the heteroplasmy of mutant mitochondrial DNAs in Leber's hereditary optic neuropathy using the Invader technology. Clin Biochem 37: 268-276, 2004.
- 5) Smith KH, Johns DR, Heher KL, Miller NR: Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. Arch Ophthalmol 111: 1486-1490, 1993.
- 6) Mashina Y, Saga N, Hiida Y, Oguchi Y, Wakakura M, Kudoh J, et al: Quantitative determination of heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy by single-strand conformation polymorphism. Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 1714-1720, 1995.
- 7) Xiao W, Oefner PJ: Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. Hum Mut 17: 439-474, 2001.
- 8) Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, et al: Optimal temperature selection for mutation detection by denatur-

- ing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* 45 : 1133—1140, 1999.
- 9) **Bunn CF, Lintott CJ, Scott RS, George PM** : Comparison of SSCP and DHPLC for the detection of LDLR mutations in a New Zealand cohort. *Hum Mutat* 19 : 311, 2002. Online Citation : Human Mutation, Mutation in Brief # 492(2002).
 - 10) **Stone EM, Fingert JH, Alward WL, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SL, et al** : Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275 : 668—670, 1997.
 - 11) **Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, et al** : Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 295 : 1077—1079, 2002.
 - 12) **Ishikawa K, Funayama T, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, et al** : A novel *MYOC* gene mutation, Phe369Leu in Japanese patients with primary open-angle glaucoma detected by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Glaucoma* 13 : 466—471, 2004.
 - 13) **Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, et al** : Variants in Optineurin gene and their association with tumor necrosis factor- α polymorphisms in Japanese patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 in press.
 - 14) **Munier FL, Korzatska E, Djemai A, Paslier DL, Zografos L, Pescia G, et al** : Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nature Genet* 15 : 247—251, 1997.
 - 15) **真島行彦, 山田昌和, 小口芳久** : *TGFBI* 変異に関連する常染色体優性遺伝角膜ジストロフィ. *日眼会誌* 105 : 659—672, 2001.
 - 16) **Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, et al** : Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242 : 1427—1430, 1998.
 - 17) **Mashima Y, Yamada K, Wakakura M, Kigawa K, Kudoh J, Shimizu N, et al** : Spectrum of pathologic mitochondrial DNA mutation and clinical features in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. *Curr Eye Res* 16 : 403—408, 1998.
 - 18) **山田恵子, 真島行彦, 緋田芳樹, 小口芳久** : 慶應義塾大学病院におけるレーベル遺伝性視神経症の遺伝子診断の現状. *日眼会誌* 105 : 608—613, 2001.
 - 19) **Mashima Y, Saga M, Hiida Y, Imamura Y, Kudoh J, Shimizu N** : Novel mutation in RP 2 gene in two brothers with X-linked retinitis pigmentosa and mtDNA mutation of Leber hereditary optic neuropathy who showed marked differences in clinical severity. *Am J Ophthalmol* 130 : 357—359, 2000.
 - 20) **Newman NJ** : Hereditary optic neuropathies. In : Miller NR, et al (Eds) : Walsh and Hoyt's clinical neuro-ophthalmology. Vol. I. 5th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 741—773, 1998.
 - 21) **Günduz K, Özdemir O** : Bilateral retrobulbar neuritis following unilateral herpes zoster ophthalmicus. *Ophthalmologica* 208 : 61—64, 1994.
 - 22) **Deane JS, Bibby K** : Bilateral optic neuritis following herpes zoster ophthalmicus. *Arch Ophthalmol* 113 : 972—973, 1995.
 - 23) **根岸一乃, 石田 晋, 安藤靖恭, 鈴木参郎助, 神園純一** : 眼部帯状疱疹後に発症した両眼性視神経ぶどう膜炎の 1 例. *あたらしい眼科* 9 : 457—461, 1992.
 - 24) **Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, et al** : Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 347 : 1916—1923, 2002.
 - 25) **Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA** : Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res* 23 : 53—89, 2004.
 - 26) **Qi X, Lewin AS, Hauswirth WW, Guy J** : Optic neuropathy induced by reductions in mitochondrial superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 1088—1096, 2003.
 - 27) **Yen MY, Kao SH, Wang AG, Wei YH** : Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA in Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 ; 45 : 1688—1691.
 - 28) **Danielson SR, Wong A, Carelli V, Martinuzzi A, Schapira AH, Cortopassi GA** : Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-Induced apoptosis. *J Biol Chem* 277 : 5810—5815, 2002.
 - 29) **Ghelli A, Zanna C, Porcelli AM, Schapira AH, Martinuzzi A, Carelli V, et al** : Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmittochondrial cells incubated with galactose medium. *J Biol Chem* 278 : 4145—4150, 2003.
 - 30) **Brown MD, Trounce IA, Jun AS, Allen JC, Wallace DC** : Functional analysis of lymphoblast

- and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J Biol Chem* 275 : 39831—39836, 2000.
- 31) **Carelli V, Ros-Cisneros FN, Sadun AA** : Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction : Genetic and acquired optic neuropathies. *Neurochem Int* 40 : 573—584, 2002.
 - 32) **Bonafe M, Salvioi S, Barbi C, Mishto M, Trapassi C, Gemelli C**, et al : p 53 codon 72 genotype affects apoptosis by cytosine arabinoside in blood leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 299 : 539—541, 2002.
 - 33) **Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd**, et al : The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33 : 357—365, 2003.
 - 34) **Skoda RC, Damierre A, McBride OW, Gonzalez FJ, Meyer UA** : Human microsomal xenobiotic epoxide hydrolase. Complementary DNA sequence, complementary DNA-directed expression in COS-1 cells, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 263 : 1549—1554, 1988.
 - 35) **Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ** : Human microsomal epoxide hydrolase : Genetic polymorphism and functional expression *in vitro* of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 3 : 421—428, 1994.
 - 36) **Mashima Y, Kimura I, Yamamoto Y, Ohde H, Ohtake Y, Tanino T**, et al : Optic disc excavation in an atrophic stage of Leber's hereditary optic neuropathy : Differentiation from normal-tension glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241 : 75—80, 2003.
 - 37) **Brierley EJ, Johnson MA, Lightowers RN, James OF, Turnbull DM** : Role of mitochondrial DNA mutations in human aging : Dmplications for the central nervous system and muscle. *Ann Neurol* 43 : 217—223, 1998.
 - 38) **Aung T, Oaka L, Ebenezer ND**, et al : A major marker for normal tension glaucoma : Association with polymorphisms in the OPA1 gene. *Hum Genet* 110 : 52—56, 2002.
 - 39) **Lamminen T, Majander A, Juvonen V, Wikstrom M, Aula P, Nikoskelainen E**, et al : A mitochondrial mutation at nt 9101 in the ATP synthase 6 gene associated with deficient oxidative phosphorylation in a family with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 56 : 1238—1240, 1995.
 - 40) **Johns DR, Neufeld MJ** : Cytochrome c oxidase mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 196 : 810—815, 1993.
 - 41) **Wissinger B, Besch D, Baumann B, Fauser S, Christ-Adler M, Jurkies B**, et al : Mutation analysis of the ND6 gene in patients with Lebers hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 234 : 511—515, 1997.
 - 42) **Majander A, Lamminen T, Juvonen V, Aula P, Nikoskelainen E, Savontaus ML**, et al : Mutations in subunit 6 of the F1F0-ATP synthase cause two entirely different diseases. *FEBS Lett* 412 : 351—354, 1997.
 - 43) **Wakakura M, Hayashi E, Toyo-oka Y, Yamabe H, Wada C, Ohtani H**, et al : Bilateral optic neuropathy with mitochondrial DNA 9804 mutation detected by non-isotopic single-strand conformational polymorphism. *Neuro-ophthalmol* 19 : 7—12, 1998.
 - 44) **Bristow EA, Griffiths PG, Andrews RM, Johnson MA, Turnbull DM** : The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch Ophthalmol* 120 : 791—796, 2002.
 - 45) **Lin HJ, Tsai FJ, Chen WC, Shi YR, Hsu Y, Tsai SW** : Association of tumour necrosis factor alpha-308 gene polymorphism with primary open-angle glaucoma in Chinese. *Eye* 17 : 31—34, 2003.
 - 46) **Kato T, Honda M, Kuwata S, Juji T, Kunugi H, Nanko S**, et al : Novel polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor alpha gene : No association with narcolepsy. *Am J Med Genet* 88 : 301—304, 1999.
 - 47) **Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H**, et al : Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor(TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 51 : 605—612, 1998.
 - 48) **Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M** : Early Manifest Glaucoma Trial Group. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression : Results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 120 : 1268—1279, 2002.
 - 49) **Tezel G, Siegmund KD, Trinkaus K, Wax MB, Kass MA, Kolker AE** : Clinical factors associated with progression of glaucomatous optic disc damage in treated patients. *Arch Ophthalmol*

- 119 : 813—818, 2001.
- 50) **Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, Morbio R, Varotto A** : Vascular risk factors for primary open angle glaucoma : The Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology* 107 : 1287—1293, 2000.
- 51) **Drance S, Anderson DR, Schulzer M** : Risk factor for progression of visual field abnormalities in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2001 ; 131 : 699—708.
- 52) **Wiggs JL, Allingham RR, Hossain A, Kern J, Auguste J, DelBono EA, et al** : Genome-wide scan for adult onset primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet* 9 : 1109—1117, 2000.
- 53) **Nemesure B, Jiao X, He Q, Leske MC, Wu SY, Hennis A, et al** : Barbados Family Study Group. A genome-wide scan for primary open-angle glaucoma (POAG) : The Barbados Family Study of Open-Angle Glaucoma. *Hum Genet* 112 : 600—609, 2003.
- 54) **Wiggs JL, Lynch S, Ynagi G, Maselli M, Auguste J, Del Bono EA, et al** : A genomewide scan identifies novel early-onset primary open-angle glaucoma loci on 9q22 and 20p12. *Am J Hum Genet* 74 : 1314—1320, 2004.
- 55) **Wagner J, Jan Danser AH, Derkx FH, de Jong TV, Paul M, Mullins JJ, et al** : Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye : Evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br J Ophthalmol* 80 : 159—163, 1996.
- 56) **Cullinane AB, Leung PS, Ortego J, Coca-Prados M, Harvey BJ** : Renin-angiotensin system expression and secretory function in cultured human ciliary body non-pigmented epithelium. *Br J Ophthalmol* 86 : 676—683, 2002.
- 57) **Wheeler-Schilling TH, Kohler K, Sautter M, Guenther E** : Angiotensin II receptor subtype gene expression and cellular localization in the retina and non-neuronal ocular tissues of the rat. *Eur J Neurosci* 11 : 3384—3394, 1999.
- 58) **Constad WH, Fiore P, Samson C, Cinotti AA** : Use of an angiotensin converting enzyme inhibitor in ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 105 : 674—677, 1988.
- 59) **Costagliola C, Verolino M, De Rosa ML, Iaccarino G, Ciancaglini M, Mastropasqua L** : Effect of oral losartan potassium administration on intraocular pressure in normotensive and glaucomatous human subjects. *Exp Eye Res* 71 : 167—171, 2000.
- 60) **Inoue T, Yokoyama T, Mori Y, Sasaki Y, Hosokawa T, Yanagisawa H, et al** : The effect of topical CS-088, an angiotensin AT1 receptor antagonist, on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in rabbits. *Curr Eye Res* 23 : 133—138, 2001.
- 61) **McGwin G Jr, MoNeal S, Owsley C, Girkin C, Epstein D, Lee PP** : Statins and other cholesterol-lowering medications and the presence of glaucoma. *Arch Ophthalmol* 122 : 822—826, 2004.
- 62) **Yu DY, Su EN, Cringle SJ, Schoch C, Percicot CP, Lambrou GN** : Comparison of the vasoactive effects of the docosanoid unoprostone and selected prostanoids on isolated perfused retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1499—1504, 2001.
- 63) **Polska E, Doelemeyer A, Luksch A, Ehrlich P, Kaehler N, Percicot CL, et al** : Partial antagonism of endothelin 1-induced vasoconstriction in the human choroid by topical unoprostone isopropyl. *Arch Ophthalmol* 120 : 348—352, 2002.

本論文で記載した遺伝子異常に関する検査(レーベル病におけるミトコンドリア DNA G 3460 A 変異, G 11778 A 変異, T 14484 C 変異の有無とヘテロプラスミー定量検査および開放隅角緑内障におけるミオシリン遺伝子 Ile 360 Asn 変異, Ala 363 Thr 変異, Gly 367 Arg 変異, Pro 370 Leu 変異, Thr 448 Pro 変異)は下記の検査受託会社で提供されている。読者の便宜のために参考までに記載する(株式会社ビー・エム・エル(<http://uwbo1.bml.co.jp/test/index.html>))。ただし、著者はこの会社と営利的あるいはそれに類似した関係はない。

Comment : 大庭 紀雄

第 108 回日本眼科学会宿題報告「眼科検査診断法：個別化医療の時代にむけての遺伝子診断」は、検査や診断の領域にも新しい時代がやってきたことを感じさせる。今や、evidence-based medicine に準じて医療を標準化し critical pathway を活用して効果的に提供する時代であるが、同じ外因に曝されて発症しても病状は個体ごとにさまざまであるし、同じライフスタイルで過ごしても生活習慣病を患う個体もあれば患わない個体もある、同じ疾病を患っても薬物に反応する個体もあれば反応しない個体もある、同じ疾病の有病率が人種や民族によって著しく異なる、といったことは日常茶飲事に経験することである。患者ごとにきめ細かに対応しようという個別化医療は、いわば ready-made から order-made へのパラダイムの変革である。こうした tailored-medicine を進めるために欠かせないのが集団や個人の遺伝情報である。分子生物学の黎明から半世紀、臨床に應用されて成功を取めたのは、Nathans の先天色覚異常(1986 年)、Wallace のレーベル遺伝性視神経症(1988 年)、Dryja の網膜色素変性(1990 年)の三つを先駆けとする単一遺伝子病原因遺伝子の発見であった。メンデル遺伝病の全貌が明らかにされて遺伝子診断学が完成するのも遠くはないであろう。一方、新課題の個別化医療の標的は多因子性遺伝病 polygenic disease (multifactorial disease)あるいは生活習慣病というカテゴリーの common disease である。対象を例示すれば、アトピー性眼症、翼状片、加齢白内障、各種緑内障、高血圧、糖尿病、加齢黄斑変性、網膜剝離と重要疾患が目白押しである。こうした広義の生活習慣病は a priori に、多数の遺伝要因と多数の環境要因とが複雑に絡み合っ成ると想定されるのだが、ヒト白血球抗原(HLA)との関連性が確認されているベーチェット病や原田病を例外として、実体的知識はほとんどない。遺伝要因を把握するための方略として今のところ有力視されているのは、箇々の疾患で関連すると考えられる候補遺伝子の多型(polymorphism)と罹病性(disease susceptibility)との関係性(association)を把握することである。この報告では、原発開放隅角緑内障 201 例・正常眼圧緑内障 234 例・健常コントロール 236 例という多数を試料として候補遺伝子 38 種類の多型頻度を調査している。個別化医療は今のところスローガンや掛け声が先行し、実践を促すにはデータ不足ではあるが、精力的に取り組まれているから今後迅速に進むのではないだろうか。そして、数千も数万もの遺伝子多型を簡単に調べる分析技術、疾病との関連性を検定するための統計分析技術が開発されるであろう。その日に備えて、患者と健常対照の良質の試料をできるだけ多く集めて保存しておくことが大切だと思う。