

# 平成 17 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

## 遺伝性眼疾患のゲノム解析と診断への応用

吉田 茂生

九州大学大学院医学研究院眼科学分野

### 要 約

眼病変は病因刺激とそれに対する生体の防御機構による反応とで示される。近年のゲノム研究の進展に伴い、大部分の単因子性の遺伝性眼疾患の原因遺伝子(病因)が明らかとなった。

遺伝性眼疾患の遺伝子解析は、診断の確定に有用である。膠様隆起性病変のない膠様滴状角膜ジストロフィや格子状病変を示さない格子状角膜ジストロフィ I 型に遭遇し、*TACSTD2* 遺伝子や *TGFBI* 遺伝子解析により診断を確定し、早期病変や加齢変化の修飾を反映していると考えた。膜型の硝子体を伴う裂孔原性網膜剝離患者に *COL2A1* 遺伝子解析を行い、眼限局型 Stickler 硝子体ジストロフィと診断し、これまで本疾患は本邦では見逃されるか、Wagner 病などと混同されてきたと思われた。

遺伝子解析は病態のより詳細な把握にも有用である。経過観察中に多彩な眼底所見を呈した家族性滲出性硝子

体網膜症患者に新規の *FZD4* 遺伝子変異を同定し、ヒト周辺網膜血管の発達に Wnt シグナル伝達系が重要であると想定された。一方、脈絡膜新生血管を生じた網膜色素線条患者の *ABCC6* 遺伝子に新規変異を認め、網膜色素線条は代謝異常症であると考えた。

今後、ゲノム医科学的手法を用いて、遺伝性眼疾患のゲノム解析を迅速かつ包括的に施行できるようになれば、原因遺伝子と臨床表現型との相関の理解を加速し、疾患概念の再分類や、病勢の予測診断をより容易にできる可能性がある。またゲノムレベルの病因から既知の病理変化へ至る分子機序を解明することで、病態の新しい理解や、確実な治療の分子標的の創出につながる事が期待される。(日眼会誌 110: 898-913, 2006)

キーワード：遺伝性眼疾患、遺伝子診断、ヒトゲノム、遺伝子型タイピングチップ

## A Review

### What Can We Learn from Molecular Genetic Analyses of Inherited Eye Diseases?

Shigeo Yoshida

Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

#### Abstract

Over the past decade, the pace of gene identification of the causes of inherited eye diseases has increased dramatically as the complete human genome information becoming available.

Molecular genetic analysis establishes reliable clinical diagnostic criteria and improves the accuracy of diagnosis. We encountered two atypical cases, a patient who had only bilateral band-shaped opacities without any gelatinous prominences, and a patient who had diffuse central corneal stromal opacity without any lattice lines. The diagnosis of

gelatinous drop-like dystrophy and lattice corneal dystrophy I was confirmed by molecular genetic analysis of *TACSTD2* and *TGFBI*, respectively. We confirmed the existence of a predominantly ocular type of stickler syndrome by identifying the mutation involving exon 2 of the *COL2A1* gene in a Japanese patient who had received a diagnosis of rhegmatogenous retinal detachment. We surmise that in Japan in the past, this diagnosis may have been overlooked or misdiagnosed as Wagner disease.

Molecular genetic analysis is also useful for gain-

別刷請求先：812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学大学院医学研究院眼科学分野 吉田 茂生

(平成 18 年 3 月 31 日受付, 平成 18 年 6 月 20 日改訂受理) E-mail: yosida@eye.med.kyushu-u.ac.jp

Reprint requests to: Shigeo Yoshida, M. D. Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received March 31, 2006 and accepted in revised form June 20, 2006)

ing a better understanding of diseases. We detected a novel *FZD4* mutation in a patient with familial exudative vitreoretinopathy who exhibited peripheral avascular areas bilaterally, a dragged disk, and retinal holes unilaterally, suggesting that *FZD4* may be involved in the angiogenesis of the human peripheral retina. Molecular genetic analysis of a Japanese patient with pseudoxanthoma elasticum with choroidal neovascularization revealed a homozygous nonsense mutation in the *ABCC6*, a member of the ABC transporter family, indicating that angioid streaks may be caused by a primary metabolic disorder.

The development of rapid and comprehensive

genotyping systems using state-of-the-art technology such as genotyping microarray may eventually offer unique and reliable diagnostic tools. This should then accelerate our understanding of the basic mechanisms underlying inherited eye diseases and their phenotypic variability, thus facilitating prospective diagnosis.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 110 : 898–913, 2006)

**Key words :** Inherited eye disease, Molecular diagnosis, Human genome, Genotyping microarray

## I はじめに

角膜や黄斑ジストロフィなどの眼科領域の遺伝性疾患は、致死的でないため決して少なくないが、一般に難治で、その病態は不明な点が多い。これらの疾患では、眼組織にどのような病因刺激が起こり、それに対してどのような生体反応が起こったために視機能が障害されるのであろうか。遺伝性眼疾患の病因を正確に明らかにしていくことは、正しい診断や治療方針の決定などに有用で、将来臨床に導入される可能性がある再生医療や遺伝子治療の適応の決定にも必要になると思われ、重要である。

2003年に生命の設計図であるヒトゲノム解読完了が宣言され、全ての遺伝子の染色体上の位置、構造、機能、個体差などの情報が加速度的に蓄積されている<sup>1)2)</sup>。ヒトゲノム完全解読により、疾患遺伝子座が位置する染色体領域を抽出すれば原因遺伝子を解明することが容易になったため(位置的候補遺伝子アプローチ)、現在では、大部分の単因子性の遺伝性眼疾患の原因遺伝子が同定された(表1)。本稿では、角膜ジストロフィ、硝子体網膜ジストロフィ、黄斑ジストロフィ、Bruch膜ジストロフィのうち我々が遺伝子解析を試みた疾患について概説し、さらに迅速診断確立の試みを述べる。

表 1 遺伝性眼疾患と原因遺伝子

臨床像	原因遺伝子
角膜ジストロフィ	<i>TGFBI, GSN, TACSTD2, CHST6, COL8A2, KRT3, KRT12</i>
先天緑内障	<i>PAX6, FOXC1, PITX2, CYP1B1</i>
先天白内障	<i>CRYAA, CRYAB, CRYBB1, CRYBB2, CRYBA1, CRYGC, CRYGD, MIP, CX50, CX46, BFSP2, PITX3, MAF, HSF4</i>
硝子体網膜ジストロフィ	<i>COL2A1, COL11A1, COL11A2, FZD4, LRP5, NDP, NR2E3, RSI</i>
黄斑ジストロフィ	<i>EFEMP1, RDS, ELOVL4, VMD2, TIMP3</i>
錐体ジストロフィ	<i>PDE6B, GUCA1A, GUCY2D, CRX, ABCA4, RHO, RDH5, FSCN2, RPGR</i>
網膜色素変性	<i>RHO, RDS, RP1, ROM1, NRL, IMPDH, PRPC8, FSCN2, CRX, PRPF31, ABCA4, RPE65, CRB1, USH2A, MERTK, RHO, CNGA1, PDE6B, LRAT, PDE6A, TULP1, RGR, RLBP1</i>
先天夜盲	<i>GNAT1, CACNA1F, SAG, RHOK, NYX, RDH5, RDS, RLBP1, CYP4V2</i>
Bruch膜ジストロフィ	<i>ABCC6</i>
脈絡膜ジストロフィ	<i>OAT, REPI</i>
遺伝性視神経萎縮	<i>OPA1, PAX2, ミトコンドリア(11778, 14484, 3460 番塩基など)</i>
色覚異常	<i>CNGA3, CNGB3, GNAT2</i>
白子症	<i>TYR, OAI</i>
Usher 症候群	<i>USH2A, MYO7A, CDH23, PCDH15</i>
Bardet-Biedl 症候群	<i>BBS4, BBS2</i>
Kearns-Sayre 症候群	ミトコンドリア
脊髄小脳変性 7 型	<i>SCA7</i>
網膜芽細胞腫	<i>RBI</i>
von Hippel-Lindau 病	<i>VHL</i>
von Recklinghausen 病	<i>NFI</i>

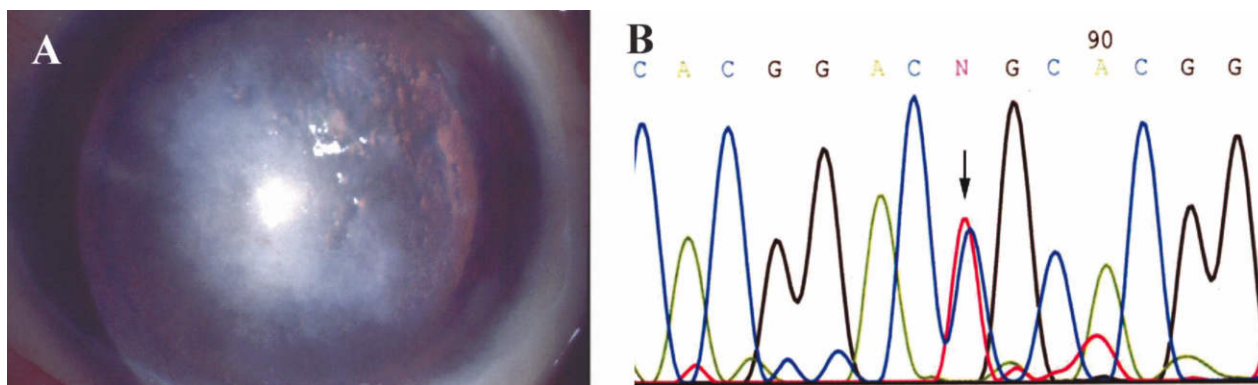


図1 格子状病変のない格子状角膜ジストロフィI型(LCDI).

A: 54歳女性, 右眼の前眼部写真.

B: transforming growth factor, beta-induced, 68 kDa 遺伝子のダイレクトシーケンスでLCDIに特異的な Arg124Cys 変異(矢印)をヘテロ接合で認めた.

(文献6より引用)

## II 遺伝性眼疾患の遺伝子解析

### 1. 角膜ジストロフィ

遺伝性, 両眼性に角膜混濁を生じる疾患である. 近年原因遺伝子の解明が最もすすんだ眼疾患群の1つである.

1) transforming growth factor, beta-induced, 68 kDa (*TGFB1*) 遺伝子関連角膜ジストロフィ (OMIM # 122200, # 607541)

10代から20代にかけて角膜実質に種々の混濁を生じ, 常染色体優性遺伝形式を示す顆粒状角膜ジストロフィ, 格子状角膜ジストロフィ, アペリノ角膜ジストロフィ, そして Reis-Bücklers 角膜ジストロフィは同一の *TGFB1* 遺伝子の異なる変異により生じることが明らかになっている<sup>3)</sup>. *TGFB1* 遺伝子は, 角膜上皮細胞の接着や進展に関与していると考えられ<sup>4)</sup>, 患者角膜の混濁中に変異蛋白の蓄積が認められる<sup>5)</sup>.

角膜ジストロフィは臨床上非典型的な病型を示すことがある. 我々は格子状病変を示さない角膜混濁のみを示す患者に対し *TGFB1* 遺伝子解析を行い, 格子状角膜ジストロフィI型(LCDI)と診断を確定した<sup>6)</sup>(図1). 我々が以前に行ったヒト眼組織のマイクロアレイ解析では, 加齢に伴い遺伝子発現レベルが変化するのを観察しており<sup>7)</sup>, 角膜の加齢に伴う遺伝子発現レベルの変化が格子状病変消失に関与した可能性を考えている<sup>6)</sup>.

2) 膠様滴状角膜ジストロフィ (OMIM # 204870)

角膜に膠様半透明の隆起物を特徴とする常染色体劣性の疾患である<sup>9)</sup>. 日本人患者の報告が多く, 典型的には膠様半透明の隆起性病変を認める.

病理学組織的に角膜上皮下に沈着物を生じ, アミロイド陽性である(図2). 疾患責任遺伝子は, 1番染色体短腕に存在する tumor-associated calcium signal transducer 2 (*TACSTD2*) 遺伝子で, その遺伝子変異により

上皮のバリアー機能が障害されると考えられている<sup>10)</sup>.

我々は典型的な膠様隆起性病変を持たない帯状の角膜混濁のみを示す患者に *TACSTD2* 遺伝子解析を行い, 日本人の好発変異である Glu 118 Stop 変異を認め, 膠様滴状角膜ジストロフィ (GDLD) と診断できた<sup>11)</sup>(図2). 観察された角膜所見は GDLD の早期の病変を反映していると考えた. これまで GDLD の臨床病型に関する詳細な記述は少なく, 近年新しい病型分類が提示されている<sup>12)</sup>.

3) 斑状角膜ジストロフィ (OMIM # 217800)

角膜実質全層に斑状の混濁を生じる常染色体劣性遺伝の疾患で, Groenouw II型とも呼ばれる<sup>13)</sup>. 発症年齢は10歳以前で, 典型的には初期では角膜中央, 表層の微細な淡い灰白色の混濁で発症し, 加齢とともに角膜全層, 全体へと混濁が増加する.

原因遺伝子は硫酸転位酵素をコードする carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6 (*CHST6*) 遺伝子である<sup>14)</sup>. 我々は周辺角膜に混濁を認め, その混濁が角膜裏面沈着物様の内皮側への膨隆を認めた非典型的な症例に対して *CHST6* 遺伝子解析を行い, 診断を確定した<sup>15)</sup>(図3). 患者ではケラタン硫酸の硫酸基付加がうまくいかず, 低硫酸化ケラタン硫酸が角膜実質全層に沈着したと考えられた.

4) 角膜ジストロフィに伴う角膜血管新生の誘導機序

膠様滴状角膜ジストロフィや格子状角膜ジストロフィなどでは進行に伴い角膜血管新生が生じる場合があるが<sup>16)</sup>, 角膜血管新生は角膜移植術後の拒絶反応の有意な危険因子であるため<sup>17)</sup>, その生成機序を把握するのは重要である.

ビトロネクチンは細胞外マトリクス分子であり, アミロイドーシスで発現が亢進するため<sup>18)</sup>, アミロイドの沈着を認める GDLD の病態形成に関与している可能性を考えた<sup>19)</sup>. そこで, 全層角膜移植術で摘出された血管新

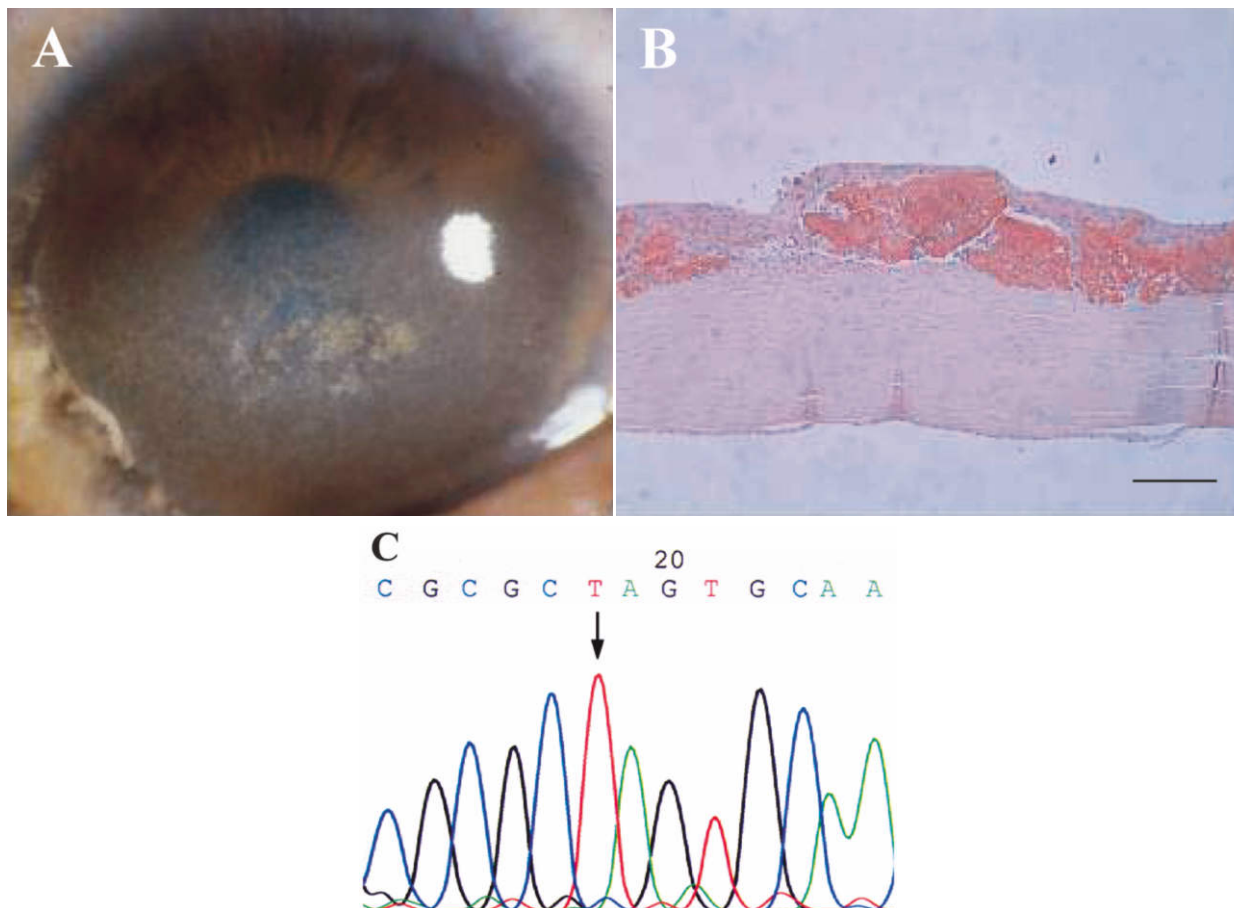


図 2 膠様隆起性病変のない膠様滴状角膜ジストロフィ.

- A : 37 歳男性, 右眼の前眼部写真. 帯状の角膜上皮混濁がみられる.
- B : 角膜病理組織顕微鏡写真. 上皮下にコンゴレッド染色陽性の沈着がみられる. 上皮は菲薄化している. バーは 200 μm.
- C : tumor-associated calcium signal transducer 2 遺伝子のダイレクトシーケンスで Glu18Stop 変異(矢印)をホモ接合で同定した.

(文献 11 より引用)

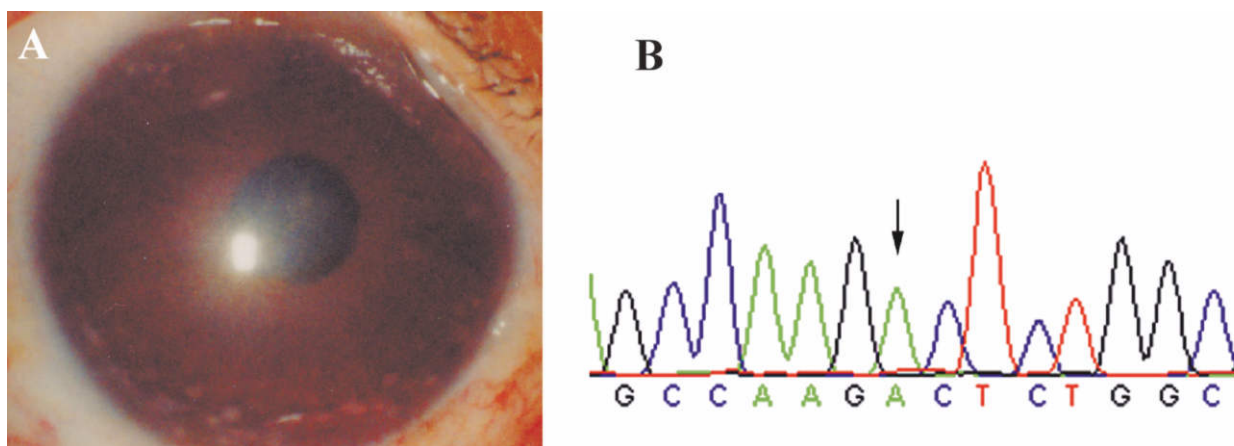


図 3 角膜周辺部の斑状の混濁を認めた斑状角膜ジストロフィ.

- A : 55 歳女性, 右眼の前眼部写真. 角膜周辺部角膜に斑状の混濁が多数みられる.
- B : carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6 遺伝子のダイレクトシーケンスで斑状角膜ジストロフィに特異的な Ala217Thr 変異(矢印)をホモ接合で同定した.

(文献 15 より引用)

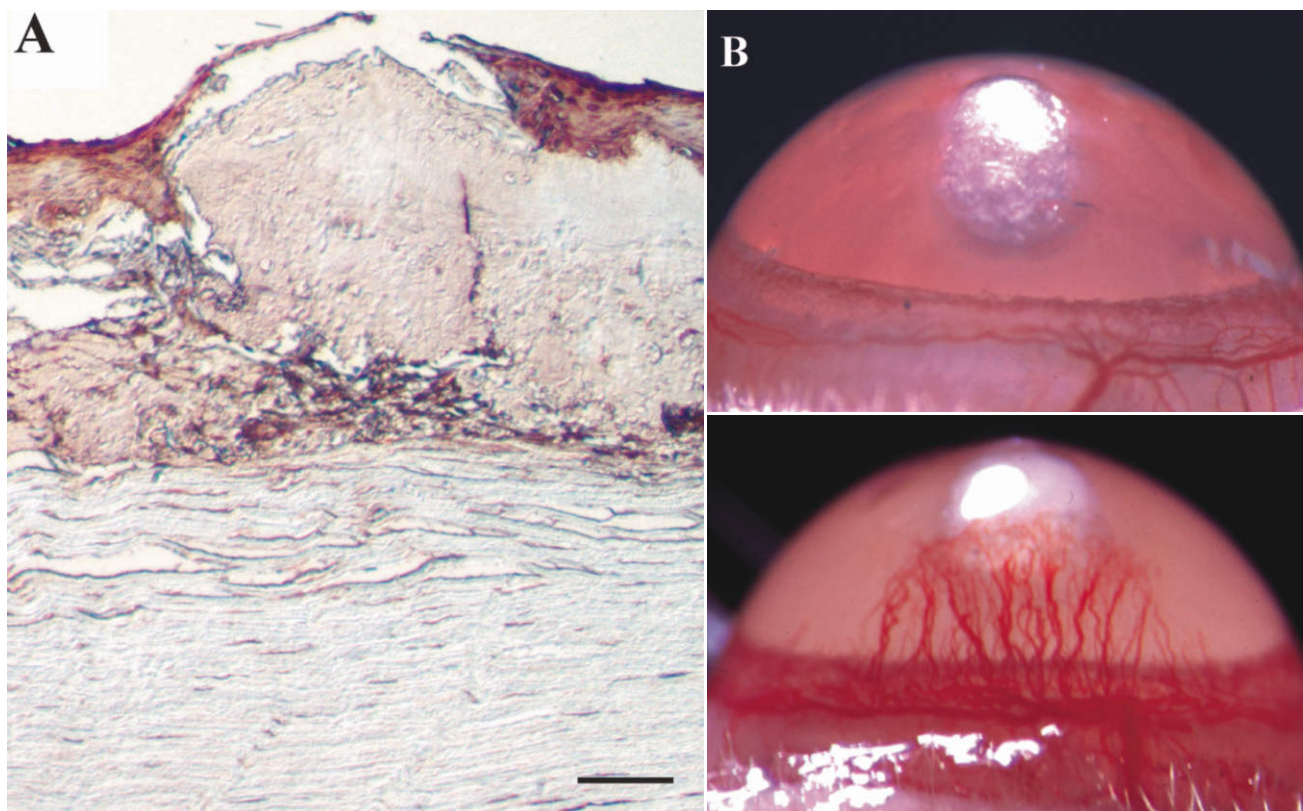


図 4 血管新生を伴う膠様滴状角膜ジストロフィ角膜でのビトロネクチンの発現。

A：全層角膜移植術摘出角膜の免疫染色。ビトロネクチンの発現が角膜上皮基底層，浸潤白血球および角膜沈着物にみられる。バーは100  $\mu\text{m}$ 。

B：ビトロネクチンの角膜血管新生誘導。生理食塩水(上段)あるいはビトロネクチン1  $\mu\text{g}$ (下段)を含んだハイドロンペレットを角膜実質に挿入し，7日後に新生血管を観察した。

(文献19より引用)

生を伴ったGDLDの角膜を用いてビトロネクチンの発現を検討したところ，角膜上皮基底層，浸潤白血球および角膜上皮下沈着物に局在していた(図4)。さらにビトロネクチン受容体であるインテグリン $\alpha\text{V}\beta3$ や $\alpha\text{V}\beta5$ は角膜血管新生に関与していることが報告<sup>20)</sup>されているため，ビトロネクチンの血管新生能をラット角膜法で検討したところ，血管新生を著明に惹起した(図4)。これらの結果より，GDLDにおいて加齢に伴い角膜にビトロネクチンが蓄積し，血管新生誘導に関与したと考えた<sup>19)</sup>。

また，我々は角膜浸潤白血球のうち単球/マクロファージ(M $\Phi$ )の角膜血管新生への関与を明らかにするため，角膜焼灼血管新生モデルを用いて以下の検討を行った。Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法で，焼灼角膜でmacrophage chemotactic protein-1(MCP-1)やmacrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )といったM $\Phi$ 走化性因子や炎症性サイトカインで血管新生能を有するinterleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )の発現上昇がみられた。これらの因子の発現は主に角膜上皮基底細胞や実質の浸潤細胞で認められた<sup>21)</sup>(図5)。免疫組織二重染色では浸潤M $\Phi$ とIL-1 $\beta$ が共染色された<sup>21)</sup>

<sup>22)</sup>(図6)。以上より我々は，病原刺激を受けた角膜上皮細胞がMCP-1などの走化性因子を産生して病変局所にM $\Phi$ を動員し，局所に遊走したM $\Phi$ がIL-1 $\beta$ やinterleukin-8(IL-8)などの血管新生促進因子を放出して角膜血管新生を誘導する機序を想定した<sup>22)23)</sup>。

## 2. 硝子体網膜ジストロフィ

硝子体の変化および異常な網膜硝子体癒着や変性など網膜硝子体に異常を生じる遺伝性疾患である。

### 1) Stickler(STL)硝子体ジストロフィ(OMIM # 108300)

網膜と硝子体の変性および強度近視を伴う常染色体優性遺伝の疾患である。強度近視，硝子体網膜変性や網膜剥離を特徴とし，関節変性，顔面低形成，難聴などの眼外症状を合併する<sup>24)</sup>。

現在まで眼科的に広く受け入れられている診断基準はないが，欧米では近年，分子遺伝学的に膜型硝子体を伴うSTL硝子体ジストロフィI型(collagen, type II, alpha 1; COL2A1 遺伝子異常)，ピーズ型硝子体を伴うII型(collagen, type XI, alpha 1; COL11A1 遺伝子異常)，眼症状を伴わないIII型(collagen, type XI, alpha 2; COL11A2 遺伝子異常)に分類されている<sup>25)</sup>。I

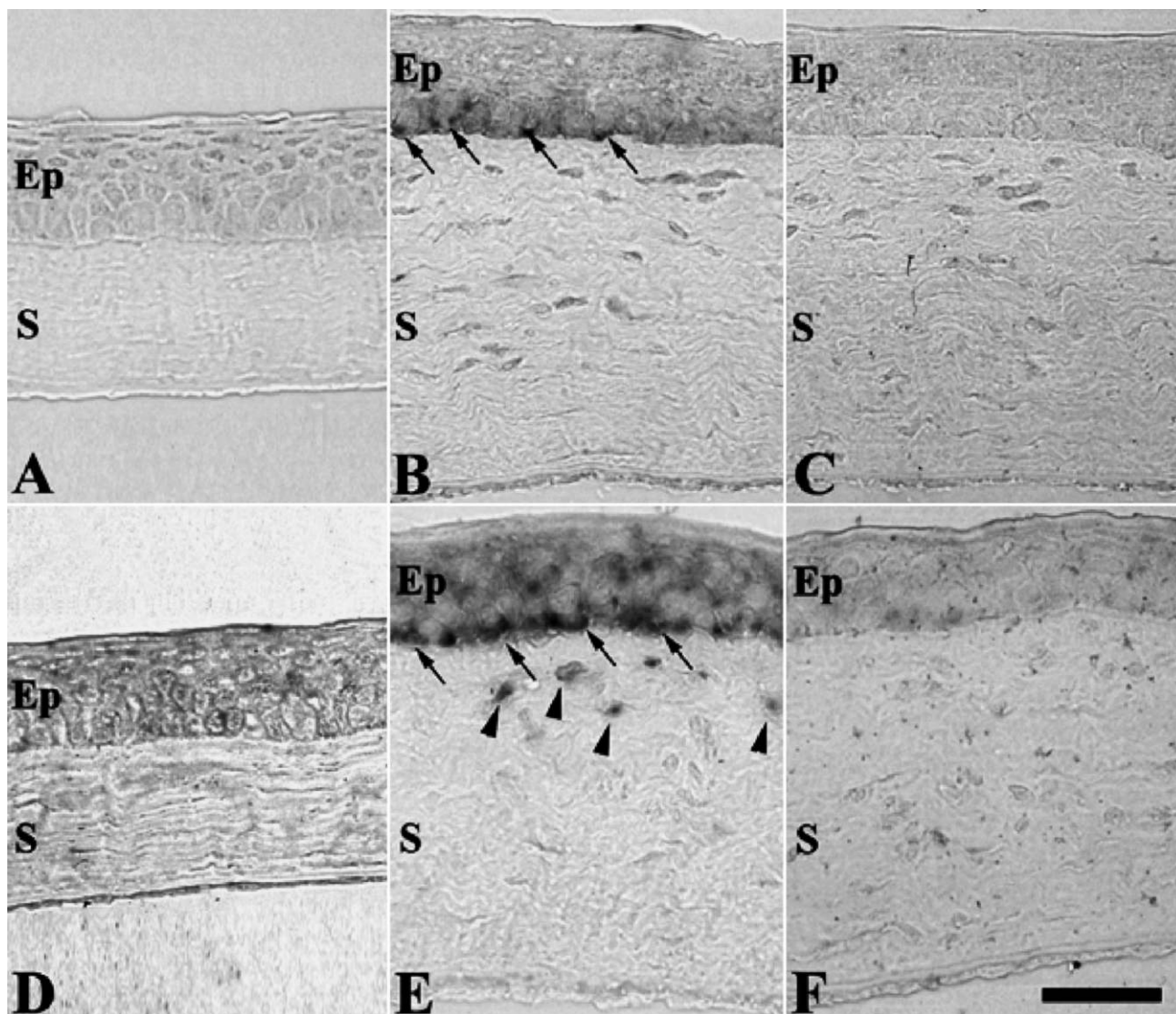


図 5 マウス角膜の *in situ* hybridization.

macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1) (A-C) と interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) (D-F) のアンチセンス (A, B, D, E) あるいはセンス (C, F) プロブを用いてハイブリダイゼーションを行った。

A, D: 未刺激角膜. B, C, E, F: 角膜焼灼 12 時間後.

MCP-1 mRNA シグナルは角膜上皮細胞(矢印)にみられる (B). IL-1  $\beta$  mRNA の発現は角膜上皮細胞(矢印)と浸潤白血球(矢じり)にみられる (E). Ep=上皮; S=実質 バーは 50  $\mu$ m.

(文献 22 より引用)

型は眼限局型 (*COL2A1* 遺伝子のエクソン 2 の異常) と眼外症状合併型に細分類されるが<sup>26)27)</sup> (図 7), エクソン 2 以外の変異でも眼に限局した病変が生じ得ると報告<sup>28)</sup> され、今後の検討を要する。

我々も、両眼に膜型の硝子体を伴う日本人の網膜剥離患者に対し、*COL2A1* 遺伝子解析を行ったところ、*COL2A1* 遺伝子のエクソン 2 に変異を認め、本邦にも眼限局型 STL 硝子体ジストロフィ I 型が存在するのを確認している<sup>29)</sup> (図 8)。眼限局型 STL 硝子体ジストロフィ I 型は眼外症状を伴わないため見落とされているか、Wagner 病などと混同されてきていると思われ (表 2), *COL2A1* 遺伝子解析が、STL 硝子体ジストロフィ

の診断確定や診断基準の確立に有用であると考えている<sup>30)</sup>。

## 2) 家族性滲出性硝子体網膜症 (FEVR) (OMIM # 133780)

周辺部網膜血管の発育不全により未熟児網膜症類似の病変を示す遺伝性疾患である。1969 年 Criswick ら<sup>31)</sup> によって初めて報告された。

近年、原因遺伝子が相次いで報告されている。FEVR には遺伝的異質性があり、遺伝形式として常染色体優性 (frizzled homolog 4; *FZD4* 遺伝子異常, low density lipoprotein receptor related protein 5; *LRP5* 遺伝子異常), 常染色体劣性 (*LRP5* 遺伝子異常), X 連鎖性

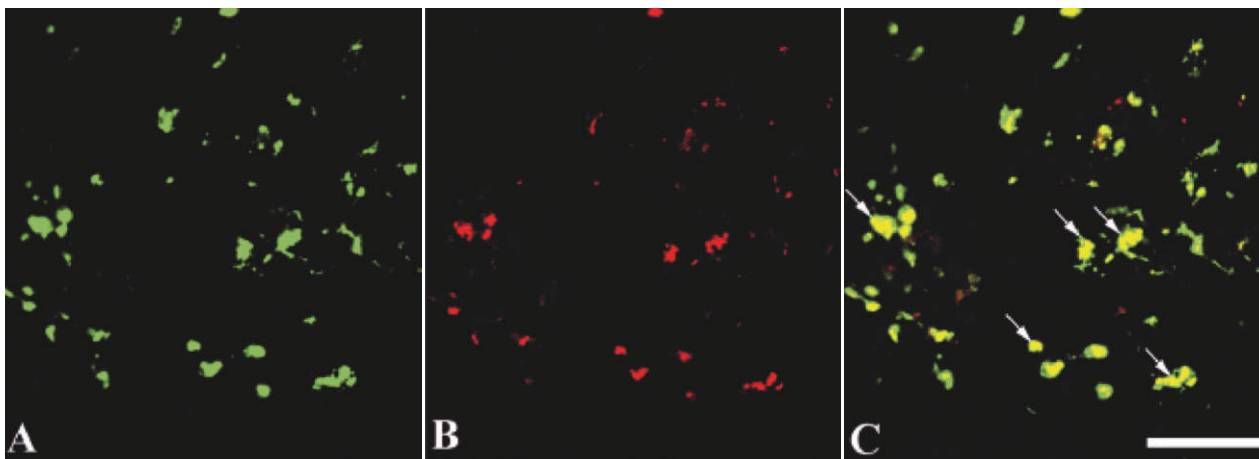


図 6 マウス焼灼角膜における IL-1β と単球/マクロファージの 2 重染色.

- A : 焼灼 2 日後角膜で F 4/80 陽性細胞が多数みられる.
- B : IL-1β 特異的染色で A と同様の染色パターンを認める.
- C : IL-1β と単球/マクロファージの 2 重染色では両抗体ともに染色陽性の細胞がみられる(矢印). バーは 50 μm.

(文献 22 より引用)

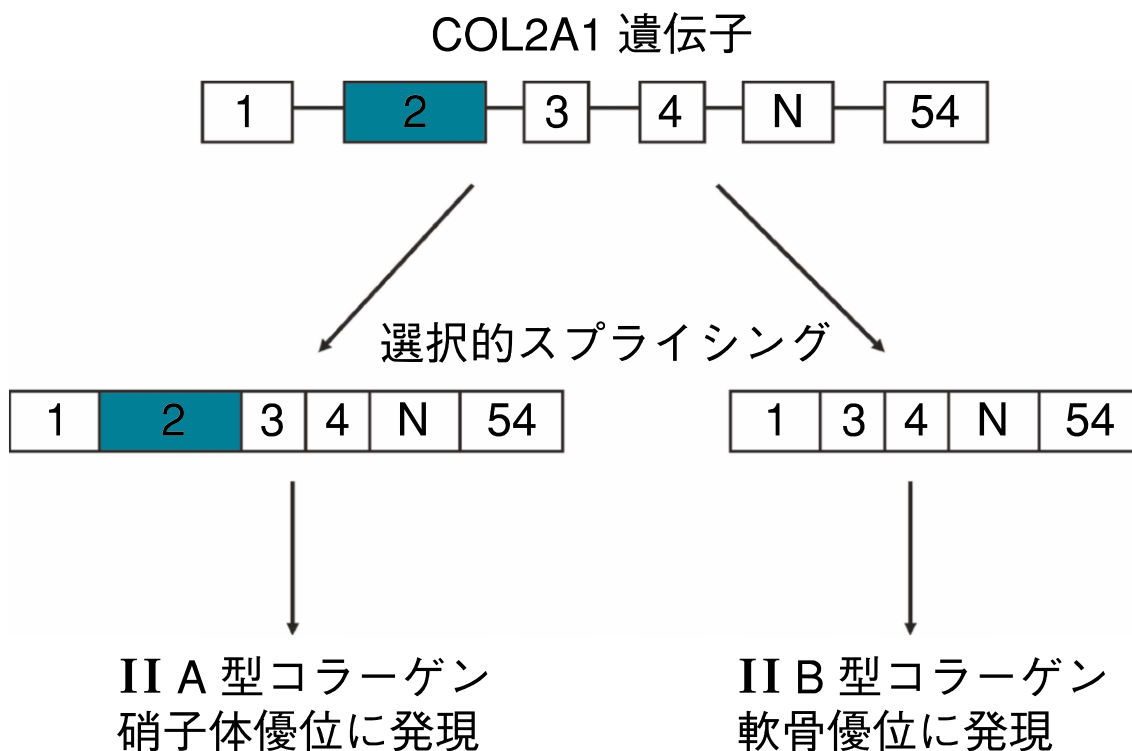


図 7 II型コラーゲンのアイソフォーム.

collagen, type II, alpha 1 (COL2A1) 遺伝子は選択的スプライシングによりエクソン 2 を含む II A 型コラーゲンと含まない II B 型コラーゲンのアイソフォームを生じる. II A 型は硝子体に, II B 型は軟骨に優位に発現している. 現在のところ, COL2A1 遺伝子のエクソン 2 の変異で眼限局型の表現型が, エクソン 2 以外の変異で全身症状合併型の Stickler 症候群を生じると考えられている.

劣性遺伝 (norrie disease ; NDP 遺伝子異常) が報告<sup>32)~35)</sup>されている.

FEVR の病変は生涯にわたって変化する可能性があり, 早期の診断と適切な時期の治療が必須である<sup>36)</sup>. 鑑別疾患である第一次硝子体過形成遺残と誤診されること

もあり<sup>37)</sup>, 診断確定には遺伝子診断が有用である場合がある. 我々も, 約 10 年間の経過観察中に内斜視, 滲出性網膜剝離, 網膜円孔など多彩な眼底所見を呈した日本人 FEVR 患者に新規の FZD4 遺伝子変異を同定した<sup>38)</sup> (図 9).

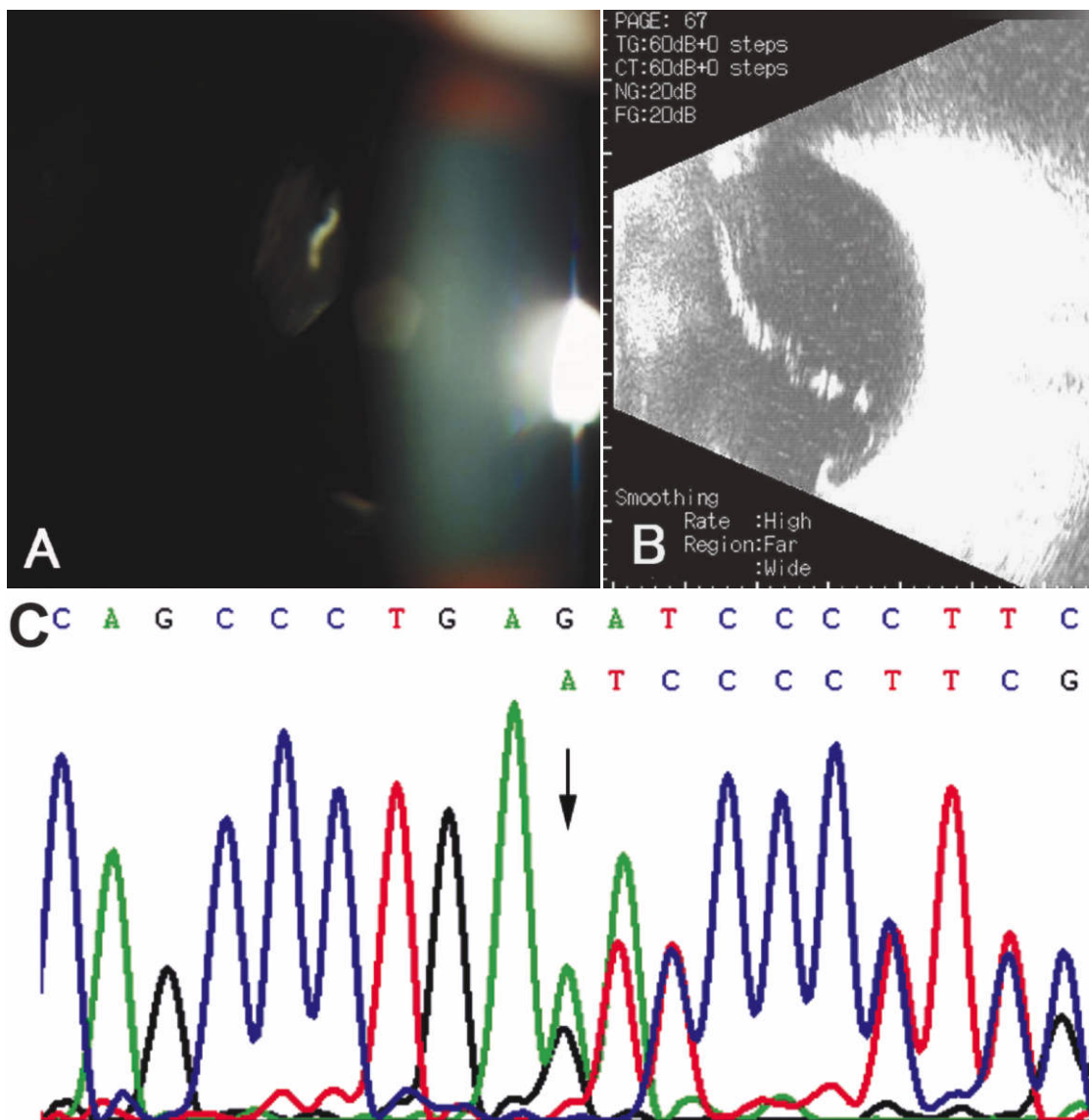


図 8 眼限局型 Stickler 硝子体ジストロフィ I 型の硝子体所見.

A : 25 歳女性, 右眼の前眼部写真.  
 B : B-モードエコー(水平断). 膜型の硝子体がみられる.  
 C : COL2A1 遺伝子のダイレクトシーケンスで新規の第 237 グアニンの欠失変異(矢印)をヘテロ接合で同定した.

(文献 29 より引用)

表 2 Stickler 硝子体ジストロフィと Wagner 病の比較

	Stickler 硝子体ジストロフィ	Wagner 病
遺伝形式	常優	常優
屈折異常	強度近視	中等度近視
硝子体異常	+	+
網膜剝離	約 50%	まれ
網脈絡膜異常	+	+
夜盲	-	+
眼外症状	±	-
原因遺伝子	Col2A1, Col11A1	CSPG2

FZD4 遺伝子, NDP 遺伝子, LRP5 遺伝子ともに Wnt シグナル伝達系に関与していることが明らかになっている<sup>39)</sup>(図 9). Wnt シグナリングはショウジョウバエからヒトに至るまで普遍的に保存されるシグナル伝達機構で, 神経の極性決定や軸索誘導に重要な役割を演じている. マウス網膜での *fdz4* 遺伝子の発現は網膜神経細胞に発現しており<sup>40)</sup>, 発達期周辺網膜神経細胞で Wnt シグナル伝達系が活性化し, 神経細胞と血管内皮細胞の巧妙な相互作用を介してヒト周辺網膜血管形成が誘導される機序が想定される.

### 3. 黄斑ジストロフィ

黄斑に進行性的変性が見られる遺伝性疾患の総称である.



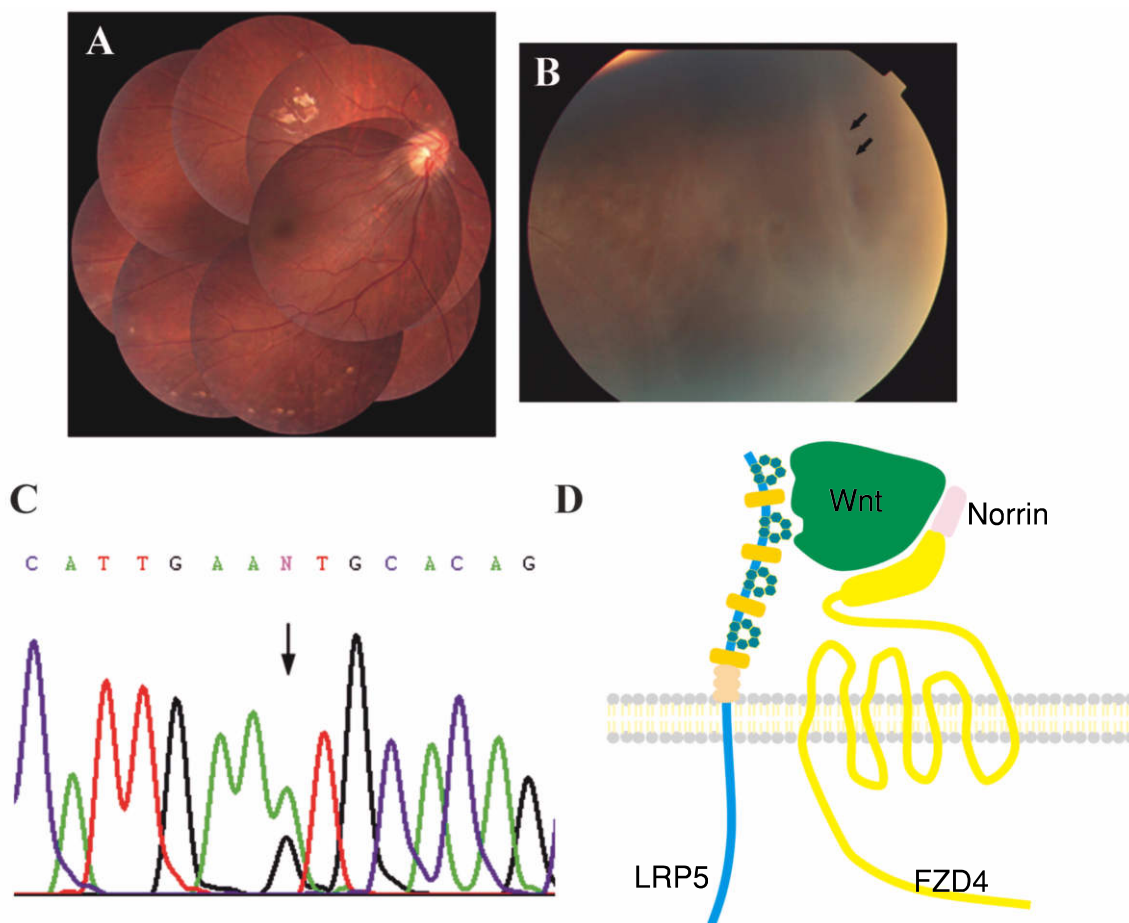


図 9 家族性滲出性硝子体網膜症。

- A : 13 歳女子の右眼の眼底写真。牽引乳頭と耳側血管の直線化がみられる。  
 B : 同一症例の左眼眼底周辺網膜。無血管野があり、網膜円孔、網膜硝子体癒着(矢印)を生じている。  
 C : frizzled homolog 4 (*FZD4*) 遺伝子のダイレクトシークエンス。595 番目のアデニン(A)からグアニン(G)へのミスセンス変異(矢印)をヘテロ接合で同定した。  
 D : Wnt 受容体複合体の模式図。7 回膜貫通型受容体である *FZD4* 遺伝子、low density lipoprotein receptor related protein 5 遺伝子、norrie disease 遺伝子は Wnt 受容体複合体を形成し、周辺部網膜血管形成を制御していると考えられる。

(文献 38 より引用)

1) 錐体(杆体)ジストロフィ (OMIM # 602093, # 120970)

錐体ジストロフィ (cone dystrophy ; COD) や錐体杆体ジストロフィ (cone-rod dystrophy ; CORD) は早期の錐体視細胞の変性による視力低下、色覚異常や中心暗点を特徴とする遺伝性網脈絡膜変性疾患の 1 つである。進行すると、錐体視細胞の変性に続き杆体視細胞の変性が起こり、夜盲や周辺視野欠損などを惹き起こす<sup>41)~43)</sup>。眼底像は多彩であり、非定型的黄斑変性、標的黃斑症や、異常のないものもある。網膜電図が診断の決め手となり、典型例では錐体系の反応が高度に減弱している。

COD や CORD の遺伝形式は多様で、これまでに優性、劣性、X 連鎖性が報告されている。遺伝的異質性も高い(表 1)。我々は臨床的に CORD と診断した患者に新規の guanylate cyclase 2 D (*GUCY2D*) 遺伝子の複合ミスセンス変異 (2540 A>T, 2541 G>C, 2542 A>C

(Gln847Leu と Lys848Gln)) を同定した<sup>44)</sup>。*GUCY2D* 遺伝子は視細胞特異的な酵素である網膜のグアニル酸シクラーゼ (RetGC-1) をコードし、網膜の 5'-guanosine monophosphate (GMP) から cyclic guanosine monophosphate (cGMP) を合成し、暗順応過程において開大した cGMP 依存性チャンネルの比率を増す。

これまで、コドン 838 のヘテロ接合性の変異が好発変異部位であることが明らかとなっているが、遺伝子解析により我々は、コドン 838 以外の *GUCY2D* 遺伝子の変異が CORD の原因となり得ることを確認した<sup>45)</sup>。さらには RetGC-1 はダイマーの状態で存在すると考えられているが<sup>46)</sup>、本症例で認められたコドン 847 と 848 の変異部位も RetGC-1 蛋白の重合化部位に存在し<sup>47)</sup>、*GUCY2D* 遺伝子の機能発現には重合化が重要であることを支持している。

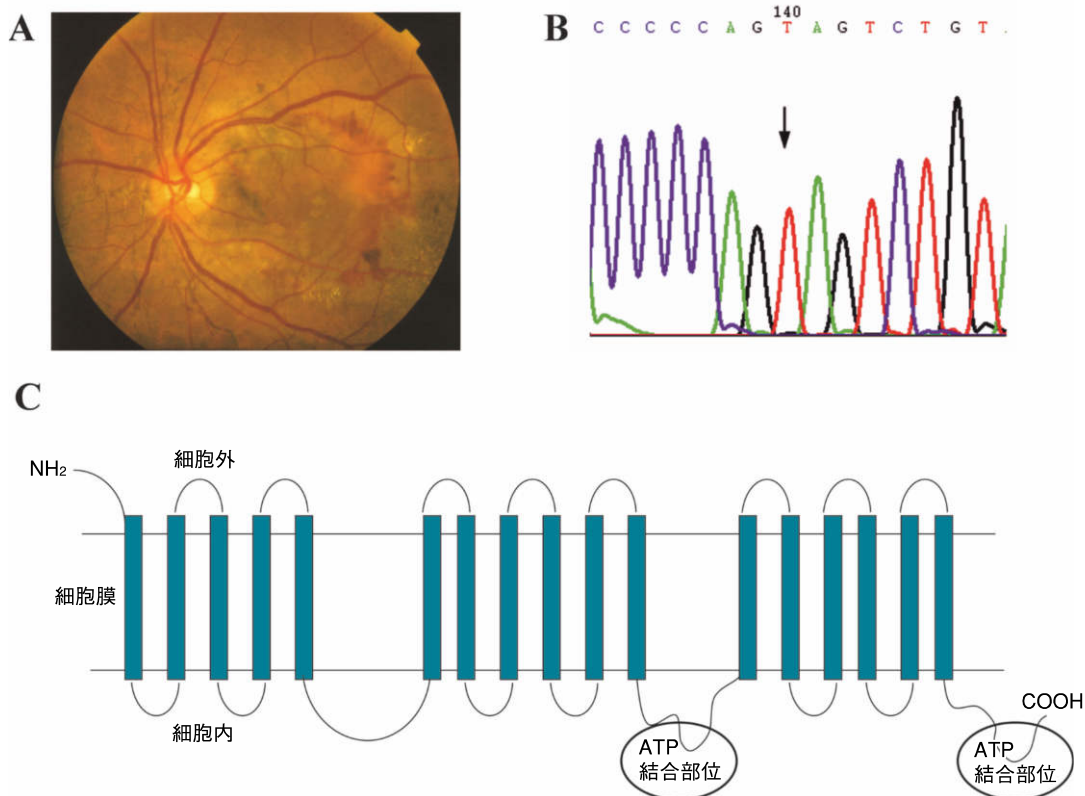


図 10 網膜色素線条。

- A：48 歳男性の左眼の眼底写真。視神経乳頭からのびる網膜色素線条を認める。黄斑部に網膜下出血，脈絡膜新生血管を生じている。
  - B：ATP-binding cassette, sub-family C, member 6 (*ABCC6*) 遺伝子のダイレクトシーケンス。1026 番目のシトシン (C) からチミン (T) へのミスセンス変異 (矢印) をホモ接合で同定した。
  - C：*ABCC6* 遺伝子蛋白の構造。3 つの膜貫通ドメインと 2 つの ATP 結合ドメインから成る。
- (文献 58 より引用)

2) 卵黄様黄斑ジストロフィ (OMIM # 153700)

特徴的な卵黄様の黄斑所見からその病名がつけられた疾患で、1905 年 Best<sup>48)</sup>により初めて報告された。遺伝形式は常染色体優性で、眼底所見は病期によって変化し、卵黄様病巣期、偽前房蓄膿期、いり卵期、萎縮期にわけられる。通常保因者でも 5 歳から 10 歳ごろまで正常眼底を示す。

患者では病期に関わらず眼球電図で明極大と暗極小の比 (L/D 比) の減少がみられる<sup>49)50)</sup>。網膜電図は通常正常である。病理組織学的には網膜色素上皮層のメラニン顆粒の増加や、異常なりポフスチン顆粒の細胞内蓄積、病巣部では視細胞層にも変性がみられる<sup>51)</sup>。

原因遺伝子として vitelliform macular dystrophy 2 (*VMD2*) 遺伝子が報告<sup>52)53)</sup>され、自験例でも既知の変異を同定している。*VMD2* 遺伝子のコードする bestrophin 蛋白は網膜色素上皮の basolateral membrane に存在するカルシウム感受性クロライドチャネルで<sup>54)</sup>、*VMD2* 遺伝子の変異により網膜色素上皮細胞の膜電流が抑制され、眼球電図の平坦化およびポフスチンの沈着が生じると考えられる<sup>55)</sup>。通常、眼球電図が診断に用

いられるが、幼児には施行不可能なため、両親の同意が得られた場合、遺伝子診断が確定に有用である。

4. Bruch 膜ジストロフィ

1) 網膜色素線条 (OMIM # 264800)

網膜色素線条は Bruch 膜の断裂により特徴的な線条が眼底にみられる常染色体劣性の疾患である。病理組織学的には Bruch 膜は肥厚、断裂し、弾性線維にカルシウムの沈着がみられる<sup>56)</sup>。

原因遺伝子は、アデノシン三リン酸結合カセット (ABC) ファミリーに属する ATP-binding cassette, sub-family C, member 6 (*ABCC6*) 遺伝子で、網膜の神経細胞で発現している<sup>57)</sup>。我々も網膜下新生血管を生じた網膜色素線条患者に新規の変異を同定している<sup>58)</sup>(図 10)。*ABCC6* 遺伝子の輸送基質はまだ明らかでないが、軟部組織のミネラルの代謝制御を介して、弾性線維の恒常性維持に重要な役割を演じていると考えられ、網膜色素線条の根本原因は代謝異常病であることが示唆される<sup>59)60)</sup>。

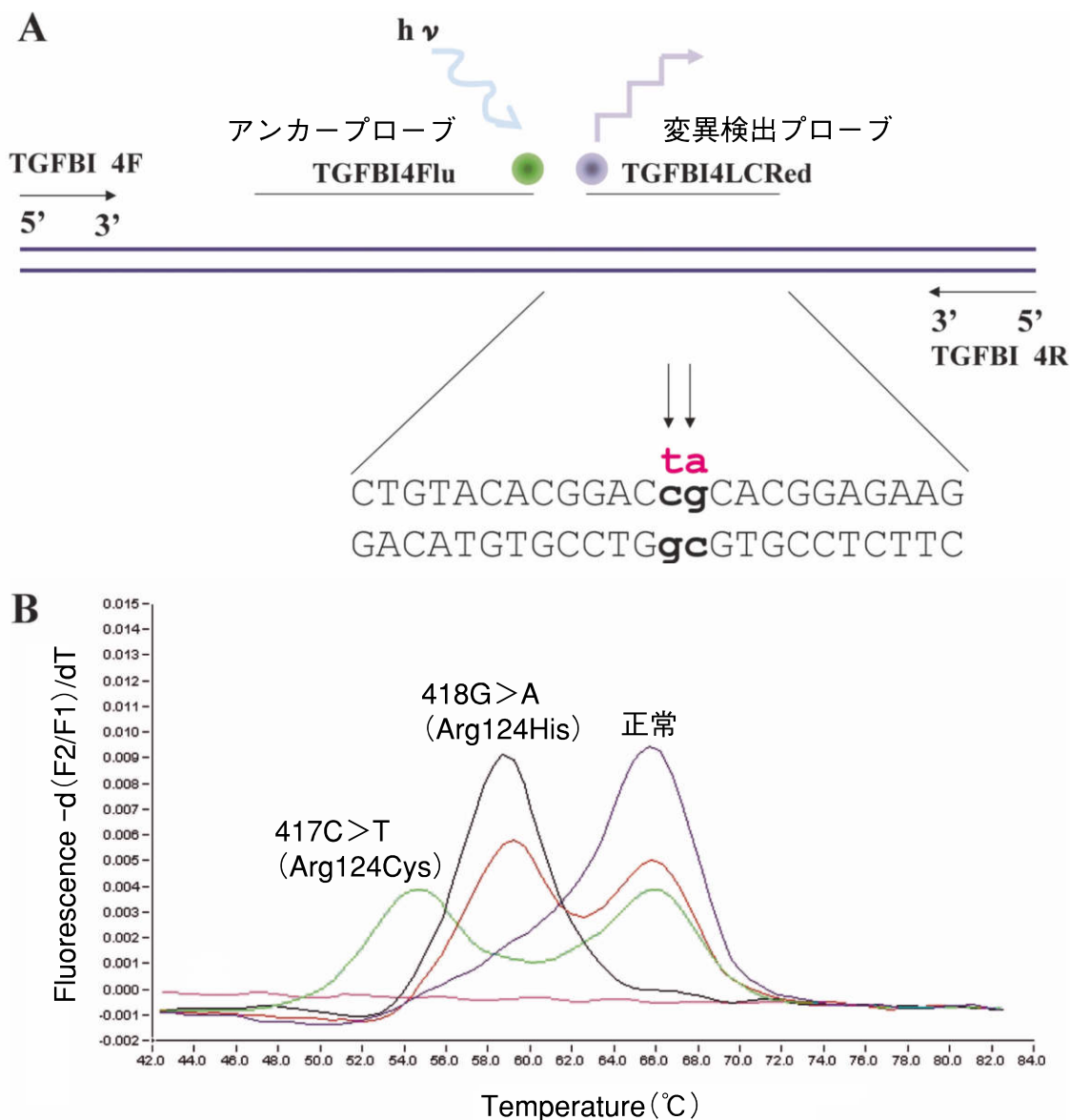


図 11 LightCycler polymerase chain reaction (PCR) を用いた角膜ジストロフィの迅速診断システム。

A: *TGFBI* 遺伝子エクソン 4 のプライマーとプローブデザインの模式図。

B: *TGFBI* 遺伝子エクソン 4 の融解曲線解析。野生型ホモ接合体、変異型ホモ接合体、ヘテロ接合体の判別には、融解曲線における蛍光強度の一次微分のピーク値 ( $T_m$  値) を用いた。各 CD の遺伝子型 (418 G>A, 417 C>T, 1710 C>T, およびワイルドタイプ) は異なる融解ピーク温度によって全例で明確に区別できた。1 回の所要時間は約 40 分であった。

(文献 63 より引用)

### III 遺伝性眼疾患の迅速診断システム開発の試み

上述のように種々の遺伝性眼疾患の原因遺伝子が明らかになったが、実際の臨床で遺伝子診断を行っている施設は現在のところ大学病院などに限られ、広く一般臨床に普及しているとはいえない。この理由の一つとして、臨床現場で運用できるような簡便、迅速な遺伝子診断法が確立されていないことが挙げられる。現在一般にゲノム解析には polymerase chain reaction (PCR)-ダイレクトシーケンシング法が用いられているが、まだ高価で、労

力も少ないとはいえず、改善の余地があると考え、以下の検討を行った。

#### 1. real-time PCR 法を用いた角膜ジストロフィの好発変異を標的とした迅速診断システム

我々は以前の報告<sup>61)</sup>と同様に、九州地方でも、*TGFBI* 遺伝子のエクソン 4 と 12 が変異の好発部位であることを確認した<sup>62)</sup>。特にエクソン 4 の隣接した塩基の変異で格子状角膜ジストロフィとアベリノ角膜ジストロフィを生じるため、この部位をターゲットとして、迅速診断システムを構築できないか試みた<sup>63)</sup>。近年のゲノム医学の進展に伴い、既知の遺伝子型を迅速かつ、ハイ

表 3 LightCycler を用いた迅速診断法と直接塩基配列決定法との比較

	LightCycler を用いた迅速診断法		直接塩基配列決定法	
所要時間	DNA 抽出	30 分	DNA 抽出	30 分
	Real-time PCR	60 分	PCR	2 時間 45 分
			電気泳動	40 分
			精製	50 分
			PCR	2 時間 30 分
			精製	40 分
			シークエンス	3 時間
	計 約 90 分		計 約 10 時間 55 分	
コンタミネーション	少ない		多い	
コスト	約 500 円		約 1500 円	
情報量	少ない		多い	

スルーブットでタイピングする方法として、マイクロアレイ法、Invader 法、TaqMan PCR 法、Hybridization Probe 法、MALDI-TOF/MS 法など数多く開発されてきているが、このうち LightCycler を使用した Hybridization Probe 法に着目した<sup>64)</sup>。本法では、2本の蛍光プローブにより PCR の各サイクルで蛍光をモニターし、遺伝子型のリアルタイム検出を行うことで、精度の高い遺伝子診断が可能である。また、PCR 後の電気泳動は不要なため、迅速、簡便で、チューブ交換によるサンプルの取り違いや、コンタミネーションの危険もない。

我々はまず、*TGFBI* 遺伝子のエキソン 4 と 12 を増幅するプライマーを設計し、各々の PCR 産物の配列内にハイブリダイズするような 3' 端をフルオレセインでラベルしたプローブと 5' 端を LCRed640 蛍光色素でラベルしたプローブを設計した(図 11 A)。それぞれのプライマーとプローブを一本のキャピラリーに混合し、PCR で増幅後、蛍光シグナルをモニターしながら、温度をゆっくりと上げて融解曲線解析を行った。すなわち、ある高温に達するとまず  $T_m$  値(融解温度: プローブとその相補鎖との間で形成される DNA ハイブリッドの安定性を特徴づける)の低い方のプローブが解離し、フルオレセインと LC Red640 の距離が離れるため蛍光強度が急激に低下する。DNA ハイブリッドにミスマッチが存在すると、完全にマッチした配列よりも解離しやすくなり、 $T_m$  値がより低い値となるため、各 PCR 産物のプローブに対する  $T_m$  値の差から遺伝子型を検出できる。融解曲線解析で、各遺伝子型(418 G>A, 417 C>T, 1710 C>T, および野生型)は異なる融解ピーク温度によって検討した 66 例全例で明確に区別でき、ダイレクトシークエンスによる結果と 100% 一致した(図 11 B)。血液採取から解析終了までの所要時間は約 1 時間 30 分で、PCR-ダイレクトシークエンス法が丸 1 日以上かかるのに比べると、迅速性や労力、コスト面で優れていると考えた(表 3)。

本法は正確であるため、現在日常の臨床診断に用いている。本法により、非典型的な臨床所見を示す *TGFBI* 遺伝子関連角膜ジストロフィの正確な診断、*TGFBI* 遺伝子関連角膜ジストロフィと紛らわしい角膜疾患における除外診断、さらに、遺伝性角膜ジストロフィのゲノム解析に基づいた疾患単位の再分類がより容易になると考えている<sup>65)</sup>。

## 2. 遺伝子型タイピングマイクロアレイを用いた原因遺伝子同定の試み

CORD など高い遺伝的異質性を示す疾患は原因遺伝子同定が難しく、まだ一般臨床で広く用いられるには至っていない。様々な候補となる遺伝子から迅速、効率的な原因遺伝子の同定法の確立が望まれる。

この目的で、我々は遺伝子型タイピングマイクロアレイの可能性を検討した<sup>66)</sup>。様々な遺伝子型タイピングマイクロアレイのうち、arrayed primer extention(AP-EX)法は 5' 末端でオリゴヌクレオチドを硝子基板の上に固定したものである<sup>66)67)</sup>。CORD 患者ゲノム DNA を PCR で増幅、酵素切断後、固定したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、4 種類の蛍光でラベルしたデオキシヌクレオチドを用いたプライマー伸長反応を行った(図 12)。その結果、変異同定には至らなかったが、マイクロアレイ解析で同定された塩基変化はすべてダイレクトシークエンスで確認され、APEX スクリーニングシステム自体の再現性は高いと考えてよいことを確認した。したがって、適切な変異部位を網羅した遺伝子型タイピングマイクロアレイを作成すれば、疾患原因遺伝子変異と疾患修飾遺伝子を同時にスクリーニングできる可能性があると考えている<sup>44)68)</sup>。

## IV おわりに

位置的候補遺伝子アプローチで明らかとなった *TGFBI* 遺伝子や *ABCC6* 遺伝子などの原因遺伝子は、今まで予想しえなかった蛋白をコードしている場合が少なくなく、従来の病理組織学や電気生理学的な知見は、原因

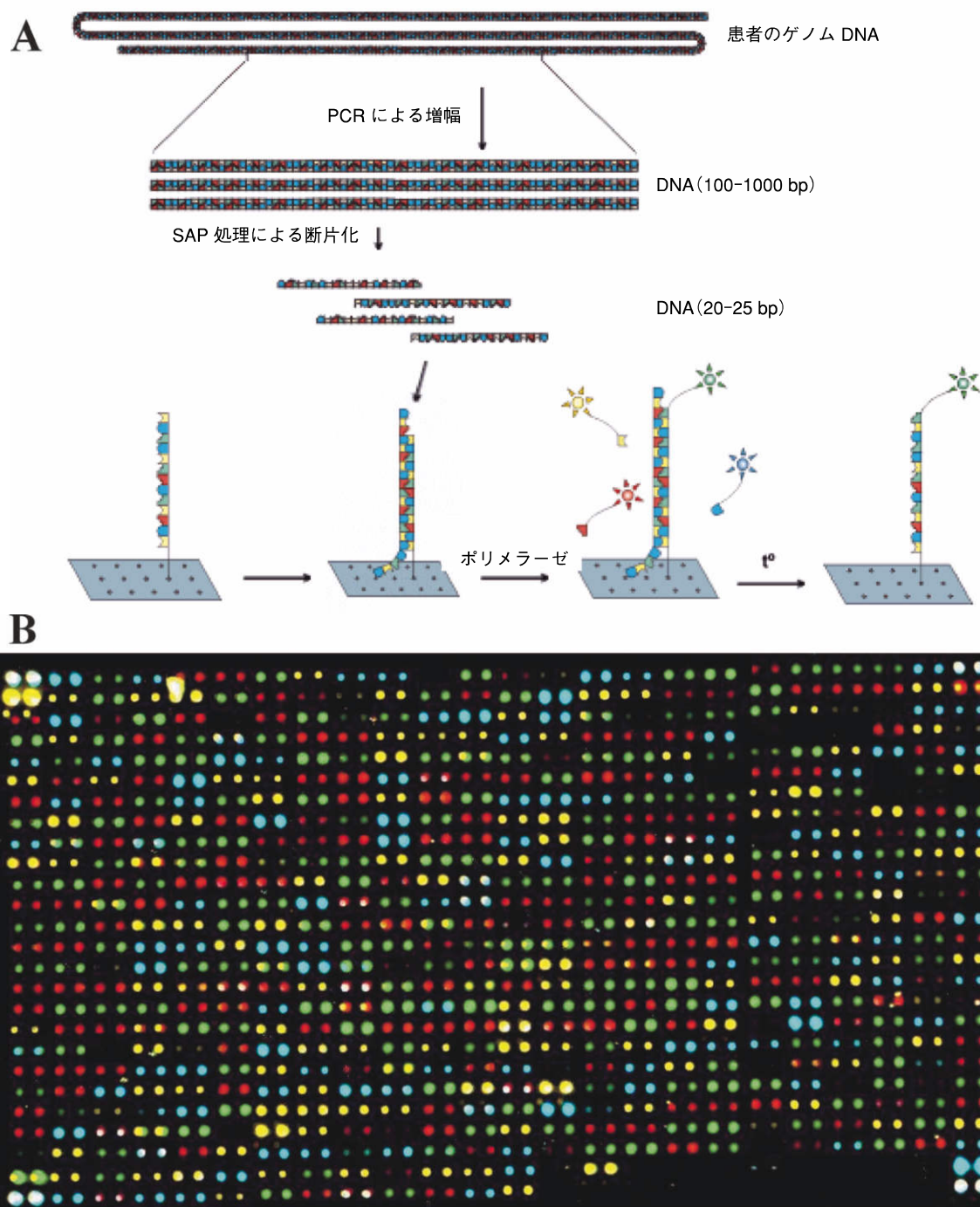


図 12 arrayed primer extension 法による遺伝子型タイピング。

A：解析のワークフロー。

検索遺伝子を PCR 法で増幅，濃縮，精製後，断片化する。断片化産物を用いて蛍光標識した ddNTP (Texas Red-ddATP, Cy 3-ddCTP, fluorescein-ddGTP, Cy 5-ddUTP) 存在下でマイクロアレイ上でプライマー伸長反応を行う。その後 20- $\mu\text{m}$  の解像度でスキャンする。(ASPER BIOTECH (<http://www.asper-bio.com>) より引用)

B：蛍光ラベルしたジデオキシヌクレオチドによるスキャン画像の false-color オーバーレイ。

遺伝子変異に対する生体反応の過程あるいは結果を反映していることが分かる。したがって，生命の設計図であるゲノムレベルでの病因把握を続行し，これを基盤にして分子機序を明らかにできれば，病態の新しい理解や，確実な治療の分子標的の創出につながっていくことが期待される。

遺伝性眼疾患といえども生涯を通じて必ずしも典型的な病型を示すわけではなく，多様な臨床所見を示すことも明らかである。今後，DNA チップなどを用いた疾患原因遺伝子や修飾遺伝子の包括的かつ迅速なゲノム解析システムが確立していけば，原因遺伝子と臨床表現型との相関の理解を加速し，病勢の予測診断をより容易にす

る可能性がある。同時に、簡便な遺伝子検出法の確立に伴う患者様や家族への遺伝カウンセリング体制の充実が必要である。また、疾患概念があいまいな STL 硝子体ジストロフィや FEVR などのゲノム解析は、より確かな診断基準の確立につながる可能性があるし、角膜ジストロフィなどでは、原因遺伝子ごとの疾患単位の再(細)分類がなされていくだろう。さらに、眼組織の発生、加齢の分子機序解明やエピジェネティクスの疾患への関与も明らかにできれば、「病気の個性」の理解が深まり、遺伝カウンセリングにも有用となるだろう。

稿を終えるにあたり、受賞口演の機会を与えてくださいました第 110 回日本眼科学会総会長大西克尚教授をはじめ学術奨励賞選考委員各位、臨床と研究の両面でご指導いただきました石橋達朗教授(九州大)、貴重な知見を与えていただきました患者様に感謝いたします。

## 文 献

- 1) **International Human Genome Sequencing Consortium** : Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 : 931—945, 2004.
- 2) **Altshuler D, Brooks LD, Chakravarti A, Collins FS, Daly MJ, Donnelly P** : A haplotype map of the human genome. *Nature* 437 : 1299—1320, 2005.
- 3) **Munier FL, Korvatska E, Djemai A, Le Paslier D, Zografos L, Pescia G, et al** : Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nat Genet* 15 : 247—251, 1997.
- 4) **Escribano J, Hernando N, Ghosh S, Crabb J, Coca-Prados M** : cDNA from human ocular ciliary epithelium homologous to beta ig-h3 is preferentially expressed as an extracellular protein in the corneal epithelium. *J Cell Physiol* 160 : 511—521, 1994.
- 5) **Korvatska E, Henry H, Mashima Y, Yamada M, Bachmann C, Munier FL, et al** : Amyloid and non-amyloid forms of 5q31-linked corneal dystrophy resulting from kerato-epithelin mutations at Arg-124 are associated with abnormal turnover of the protein. *J Biol Chem* 275 : 11465—11469, 2000.
- 6) **Yoshida S, Yoshida A, Nakao S, Emori A, Nakamura T, Fujisawa K, et al** : Lattice corneal dystrophy type I without typical lattice lines : role of mutational analysis. *Am J Ophthalmol* 137 : 586—588, 2004.
- 7) **Carter TA, Greenhall JA, Yoshida S, Fuchs S, Helton R, Swaroop A, et al** : Mechanisms of aging in senescence-accelerated mice. *Genome Biol* 6 : R 48, 2005.
- 8) **Yoshida S, Yashar BM, Hirianna S, Swaroop A** : Microarray analysis of gene expression in the aging human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2554—2560, 2002.
- 9) **清沢又四郎** : 一種の家族性角膜変性(膠様滴状角膜変性)ニ就キテ. *日眼会誌* 36 : 1634—1645, 1932.
- 10) **Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Nishida K, Shimomura Y, Tano Y, et al** : Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat Genet* 21 : 420—423, 1999.
- 11) **Yoshida S, Kumano Y, Yoshida A, Numa S, Yabe N, Hisatomi T, et al** : Two brothers with gelatinous drop-like dystrophy at different stages of the disease : role of mutational analysis. *Am J Ophthalmol* 133 : 830—832, 2002.
- 12) **Ide T, Nishida K, Maeda N, Tsujikawa M, Yamamoto S, Watanabe H, et al** : A spectrum of clinical manifestations of gelatinous drop-like corneal dystrophy in Japan. *Am J Ophthalmol* 137 : 1081—1084, 2004.
- 13) **Groenouw A** : Knütchenförmige Hornhauttrübungen (noduli corneae). *Arch Augenheilkd* 21 : 281—289, 1890.
- 14) **Akama TO, Nishida K, Nakayama J, Watanabe H, Ozaki K, Nakamura T, et al** : Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene. *Nat Genet* 26 : 237—241, 2000.
- 15) **沼慎一郎, 吉田茂生, 熊野祐司, 山地陽子, 石橋達朗** : 遺伝子解析が有用であった斑状角膜ジストロフィの一例. *臨眼* : 2021—2023, 2005.
- 16) **Smolin G** : Corneal dystrophies and degenerations. In : Smolin G, et al (Eds) : *The Cornea*, 2nd Edition. Little, Brown and Company, Boston, 499—533, 1995.
- 17) **Price MO, Thompson RW Jr, Price FW Jr** : Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts. *Arch Ophthalmol* 121 : 1087—1092, 2003.
- 18) **Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS** : 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* 14 : 835—846, 2000.
- 19) **Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, Kumano Y, Matsui T** : Presence of vitronectin in neovascularized cornea of patient with gelatinous drop-like dystrophy. *Br J Ophthalmol* 87 : 368—369, 2003.
- 20) **Stupack DG, Cheresh DA** : ECM remodeling regulates angiogenesis : endothelial integrins look for new ligands. *Sci STKE* 2002 : PE 7, 2002.
- 21) **Ogawa S, Yoshida S, Ono M, Onoue H, Ito Y, Ishibashi T, et al** : Induction of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor during inflammatory neovascularization in the mouse cornea. *Angiogenesis* 3 : 327—334, 1999.
- 22) **Yoshida S, Yoshida A, Matsui H, Takada Y, Ishibashi T** : Involvement of macrophage chemotactic protein-1 and interleukin-1 beta during

- inflammatory but not basic fibroblast growth factor-dependent neovascularization in the mouse cornea. *Lab Invest* 83 : 927—938, 2003.
- 23) **Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, Elnor SG, Elnor VM** : Role of MCP-1 and MIP-1 alpha in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J Leukoc Biol* 73 : 137—144, 2003.
  - 24) **Stickler GB, Belau PG, Farrell FJ, Jones JD, Pugh DG, Steinberg AG, et al** : Hereditary Progressive Arthro-Ophthalmopathy. *Mayo Clin Proc* 40 : 433—455, 1965.
  - 25) **Snead MP, Yates JR** : Clinical and Molecular genetics of Stickler syndrome. *J Med Genet* 36 : 353—359, 1999.
  - 26) **Richards AJ, Martin S, Yates JR, Scott JD, Baguley DM, Pope FM, et al** : COL2A1 exon 2 mutations : relevance to the Stickler and Wagner syndromes. *Br J Ophthalmol* 84 : 364—371, 2000.
  - 27) **Donoso LA, Edwards AO, Frost AT, Ritter R, Ahmad NN, Vrabc T, et al** : Identification of a stop codon mutation in exon 2 of the collagen 2A1 gene in a large stickler syndrome family. *Am J Ophthalmol* 134 : 720—727, 2002.
  - 28) **Go SL, Maugeri A, Mulder JJ, van Driel MA, Cremers FP, Hoyng CB** : Autosomal dominant rhegmatogenous retinal detachment associated with an Arg453Ter mutation in the COL2A1 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4035—4043, 2003.
  - 29) **Yoshida S, Yamaji Y, Kuwahara R, Yoshida A, Hisatomi T, Ueno A, et al** : Novel mutation in exon 2 of COL2A1 gene in Japanese family with Stickler Syndrome type I. *Eye* 20 : 743—745, 2005.
  - 30) **Parke DW** : Stickler syndrome : clinical care and molecular genetics. *Am J Ophthalmol* 134 : 746—748, 2002.
  - 31) **Criswick VG, Schepens CL** : Familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 68 : 578—594, 1969.
  - 32) **Robitaille J, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dube MP, et al** : Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet* 32 : 326—330, 2002.
  - 33) **Jiao X, Ventruto V, Trese MT, Shastry BS, Hejtmancik JF** : Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in LRP 5. *Am J Hum Genet* 75 : 878—884, 2004.
  - 34) **Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM, Towns KV, Scott S, Mackey DA, et al** : Mutations in LRP 5 or FZD 4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet* 74 : 721—730, 2004.
  - 35) **Chen ZY, Battinelli EM, Fielder A, Bunday S, Sims K, Breakefield XO, et al** : A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet* 5 : 180—183, 1993.
  - 36) **Benson WE** : Familial exudative vitreoretinopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 93 : 473—521, 1995.
  - 37) **Chang-Godinich A, Paysse EA, Coats DK, Holz ER** : Familial exudative vitreoretinopathy mimicking persistent hyperplastic primary vitreous. *Am J Ophthalmol* 127 : 469—471, 1999.
  - 38) **Yoshida S, Arita R, Yoshida A, Tada H, Emori A, Noda Y, et al** : Novel mutation in FZD4 gene in a Japanese pedigree with familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 138 : 670—671, 2004.
  - 39) **Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, et al** : Vascular development in the retina and inner ear : control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116 : 883—895, 2004.
  - 40) **Liu H, Mohamed O, Dufort D, Wallace VA** : Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev Dyn* 227 : 323—334, 2003.
  - 41) **Moore AT** : Cone and cone-rod dystrophies. *J Med Genet* 29 : 289—290, 1992.
  - 42) **Rabb MF, Tso MO, Fishman GA** : Cone-rod dystrophy. A clinical and histopathologic report. *Ophthalmology* 93 : 1443—1451, 1986.
  - 43) **三宅養三** : 黄斑ジストロフィ. *日眼会誌* 107 : 229—241, 2003.
  - 44) **Yoshida S, Yamaji Y, Yoshida A, Kuwahara R, Yamamoto K, Kubota T, et al** : Novel triple missense mutations of GUCY2D gene in Japanese family with cone-rod dystrophy : Possible use of genotyping microarray, *Mol Vis* 2006 (in press).
  - 45) **Ito S, Nakamura M, Nuno Y, Ohnishi Y, Nishida T, Miyake Y** : Novel complex GUCY2D mutation in Japanese family with cone-rod dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1480—1485, 2004.
  - 46) **Yang RB, Garbers DL** : Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers. *J Biol Chem* 272 : 13738—13742, 1997.
  - 47) **Kelsell RE, Gregory-Evans K, Payne AM, Perrault I, Kaplan J, Yang RB, et al** : Mutations in the retinal guanylate cyclase (RETGC-1) gene in dominant conerod dystrophy. *Hum Mol Genet* 7 : 1179—1184, 1998.
  - 48) **Best F** : Ueber eine hereditaere Maculaaffektion. *Z. Augenheilk* 13 : 199—212, 1905.
  - 49) **Arden GB** : Alterations in the standing potential of the eye associated with retinal disease. *Trans Ophthalmol Soc UK* 82 : 63—72, 1962.
  - 50) **Cross HE, Bard L** : Electro-oculography in Best's macular dystrophy. *Am J Ophthalmol* 77 : 46—50,

- 1974.
- 51) **Weingeist TA, Hermsen V, Hanson JW, Bumsted RM, Weinstein SL, Olin WH** : Ocular and systemic manifestations of Stickler's syndrome : a preliminary report. *Birth Defects Orig Artic Ser* 18 : 539—560, 1982.
  - 52) **Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T**, et al : Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet* 19 : 241—247, 1998.
  - 53) 塩瀬聡美, 吉田茂生, 山地陽子, 石橋達朗 : 変異解析を行った卵黄様黄斑ジストロフィの 1 例. 網脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究. 平成 16 年度 総括・分担研究報告書 : 35—36, 2005.
  - 54) **Marmorstein AD, Marmorstein LY, Rayborn M, Wang X, Hollyfield JG, Petrukhin K** : Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 12758—12763, 2000.
  - 55) **Sun H, Tsunenari T, Yau KW, Nathans J** : The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 4008—4013, 2002.
  - 56) **Dreyer R, Green WR** : The pathology of angioid streaks : a study of twentyone cases. *Trans Pa Acad Ophthalmol Otolaryngol* 31 : 158—167, 1978.
  - 57) **Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H**, et al : Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25 : 228—231, 2000.
  - 58) **Yoshida S, Honda M, Yoshida A, Nakao S, Goto Y, Nakamura T**, et al : Novel mutation in ABCC6 gene in a Japanese pedigree with pseudoxanthoma elasticum and retinitis pigmentosa. *Eye* 19 : 215—217, 2005.
  - 59) **Uitto J** : Pseudoxanthoma elasticum—a connective tissue disease or a metabolic disorder at the genome/environment interface? *J Invest Dermatol* 122 : ix—x, 2004.
  - 60) **Klement JF, Matsuzaki Y, Jiang QJ, Terlizzi J, Choi HY, Fujimoto N**, et al : Targeted ablation of the abcc6 gene results in ectopic mineralization of connective tissues. *Mol Cell Biol* 25 : 8299—8310, 2005.
  - 61) **Mashima Y, Yamamoto S, Inoue Y, Yamada M, Konishi M, Watanabe H**, et al : Association of autosomal dominantly inherited corneal dystrophies with BIGH3 gene mutations in Japan. *Am J Ophthalmol* 130 : 516—517, 2000.
  - 62) **Yoshida S, Kumano Y, Yoshida A, Hisatomi T, Matsui H, Nishida T**, et al : An analysis of BIGH3 mutations in patients with corneal dystrophies in the Kyushu district of Japan. *Jpn J Ophthalmol* 46 : 469—471, 2002.
  - 63) **Yoshida S, Yamaji Y, Yoshida A, Noda Y, Kumano Y, Ishibashi T** : Rapid genotyping for most common TGFBI mutations with real-time polymerase chain reaction. *Hum Genet* 116 : 518—524, 2005.
  - 64) **Gotting C, Schulz V, Hendig D, Grundt A, Dreier J, Szliska C**, et al : Assessment of a rapid-cycle PCR assay for the identification of the recurrent c.3421 C>T mutation in the ABCC6 gene in pseudoxanthoma elasticum patients. *Lab Invest* 84 : 122—130, 2004.
  - 65) 吉田茂生 : もっと速く患者様の病因が知りたい. あたらしい眼科 23 : 771—774, 2006.
  - 66) **Mockler TC, Chan S, Sundaresan A, Chen H, Jacobsen SE, Ecker JR** : Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics* 85 : 1—15, 2005.
  - 67) **Kurg A, Tonisson N, Georgiou I, Shumaker J, Tollett J, Metspalu A** : Arrayed primer extension : solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology. *Genet Test* 4 : 1—7, 2000.
  - 68) **Zernant J, Kulm M, Dharmaraj S, den Hollander AI, Perrault I, Preising MN**, et al : Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis : detection of modifier alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3052—3059, 2005.
-