
 総 説

網膜変性疾患とレチノイドサイクル

 前田 忠郎¹⁾²⁾³⁾, 前田亜希子²⁾³⁾, 大黒 浩³⁾
¹⁾ケースウェスタンリザーブ大学眼科学教室

²⁾ケースウェスタンリザーブ大学薬理学教室

³⁾札幌医科大学眼科学講座

要 約

レチノイドサイクルは視細胞外節と網膜色素上皮細胞間に存在するビタミン A 代謝回路であり、視覚を維持するために必須である。レチノイドサイクルの異常により一部の遺伝性網膜変性疾患、加齢黄斑変性との関連が明らかにされつつあり、今まで有効な治療がなかったこれらの疾患に対し、その分子病態に基づいた新しい治療の臨床応用が期待されている。

本総説ではレチノイドサイクルの全体像およびその異常による網膜変性疾患の分子病態について個々の遺伝子ごとにこれまでの報告をまとめ、現在提唱されている新

たな治療法について解説した。

レチノイドサイクルに関連する網膜変性疾患の分子病態が著しい速さで明らかにされてきており、その病態に合わせた遺伝子ならびに薬物治療が開発され、実践的な治療が実施されつつある。(日眼会誌 113 : 83—94, 2009)

キーワード：レチノイドサイクル、ビタミン A、網膜変性疾患、遺伝子異常、加齢黄斑変性

 A Review

Retinal Degeneration Diseases and the Retinoid Cycle

 Tadao Maeda¹⁾²⁾³⁾, Akiko Maeda²⁾³⁾ and Hiroshi Ohguro³⁾
¹⁾Department of Ophthalmology, Case Western Reserve University

²⁾Department of Pharmacology, Case Western Reserve University

³⁾Department of Ophthalmology, Sapporo Medical University

Abstract

The retinoid cycle is a vitamin A metabolic circuit which occurs between the photoreceptor outer segment and the retinal pigmented epithelium to maintain visual function. Abnormalities in the retinoid cycle are involved in some hereditary retinal degenerative diseases and age-related retinal degeneration.

Here, we summarize the entire process of the retinoid cycle and the pathophysiology of those retinal diseases due to molecular abnormalities of the cycle. Gene transfer and pharmacologic treatment have been developed based on recent studies revealing characteristic clinical features initiated by each

aberrant reaction in the retinoid cycle.

The molecular mechanisms of retinal degeneration caused by an abnormal retinoid cycle have been investigated intensively, and practical therapies have been introduced for currently incurable retinal diseases.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 83—94, 2009)

Key words : Retinoid cycle, Vitamin A, Retinal degeneration disease, Inherited retinal diseases, Age-related macular degeneration

別刷請求先：060-8543 札幌市中央区南 1 条西 16 札幌医科大学医学部眼科学講座 大黒 浩
(平成 20 年 7 月 4 日受付, 平成 20 年 9 月 25 日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Ohguro, M.D. Department of Ophthalmology, Sapporo Medical University School of Medicine, South-1 West-16, Chuo-ku, Sapporo-shi 060-8543, Japan

(Received July 4, 2008 and accepted in revised form September 25, 2008)

I 緒 言

網膜視細胞の最も重要な生理作用である光情報伝達機構は後述するレチノイドサイクルと呼ばれる生化学反応によりもたらされる。近年、長年にわたり明らかにされてきたレチノイドサイクルにおける基礎的研究の蓄積を眼科臨床へと応用するいわゆるトランスレーショナルリサーチにより有効な治療のなかった一部の網膜変性疾患に対する新しい治療法が見出され、実際の臨床で応用できる可能性が出てきた。

網膜変性疾患において、網膜再生や人工網膜などの外科的対症療法ではなく、詳細な病因研究に基づく病態機序に応じた薬物ならびに遺伝子治療を探るという重要な局面の一つとして、本総説ではレチノイドサイクルに属する分子の役割と網膜変性疾患への関与について解説する。同時に、重要な新しい知見を紹介し、今後どのような発展が期待できるのかを提示したい。

II 網膜内におけるレチノイド代謝 (retinoid cycle または visual cycle)

視覚は、錐体視細胞または桿体視細胞外節に存在する視物質(光感受性 G 蛋白質結合受容体であるコーンオブ

シンまたはロドプシン)の光の吸収による活性化により惹起される連続的な酵素反応；光情報伝達機構(phototransduction cascade)により開始される。視物質活性化は、その中心部に結合するビタミン A 誘導体 11-*cis*-retinal の光異性化(photo-isomerization)による all-*trans*-retinal への構造変化により発生し、光異性化後、all-*trans*-retinal は視細胞外節から網膜色素上皮細胞(retinal pigmented epithelium : RPE)に輸送され 11-*cis*-retinal に再合成され、再び視細胞外節へと運搬され視覚を維持するために視物質再生に利用される。この視細胞外節と RPE 間で行われる 11-*cis*-retinal 再生のための一連の酵素反応はレチノイドサイクルと呼ばれている(図 1)。

1. 円板膜内側膜から外側膜への all-*trans*-retinal の輸送について

光受容により視物質に結合する 11-*cis*-retinal が all-*trans*-retinal に光異性化され、ロドプシン結合部位から放出される。このときに大部分の all-*trans*-retinal はロドプシンの存在する円板膜の外側膜に放出されるが、一部は内側膜に放出される。内側膜に放出された all-*trans*-retinal は網膜内のエタノールアミン(phosphatidylethanolamine : PE)と結合し、N-retinylidene-PE (N-ret-PE) となり、ATP-binding cassette transporter (ABCR)

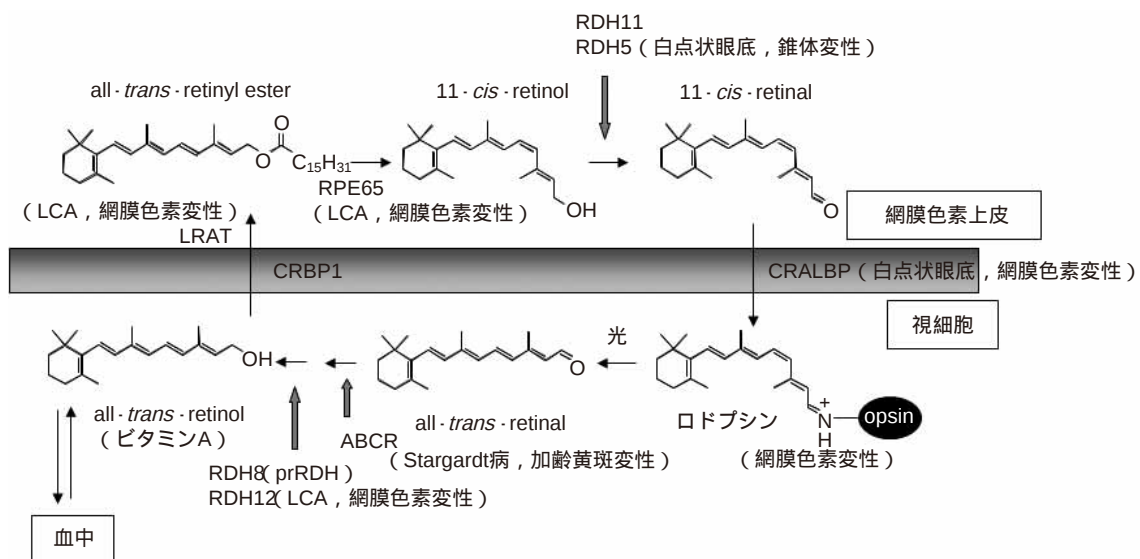


図 1 レチノイドサイクルと網膜疾患.

視細胞内でロドプシンに結合する 11-*cis*-retinal が all-*trans*-retinal に光異性化すると all-*trans*-retinal は外節内円板膜の内側膜と外側膜の両所に放出され、内側膜に放出された all-*trans*-retinal は ABCR (ATP-binding cassette transporter) により外側膜に移送され、視細胞内の all-*trans*-retinol dehydrogenase (RDH 8, RDH 12) により all-*trans*-retinol (ビタミン A) に還元され網膜色素上皮細胞に輸送され、LRAT (lecithin : retinol acyltransferase) により all-*trans*-retinyl ester に変換後 retinosome 内に貯蓄される。この all-*trans*-retinyl ester は RPE 65 (retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa) によって 11-*cis*-retinol となり、11-*cis*-retinol dehydrogenase (RDH 5, RDH 11) によって 11-*cis*-retinal に再生され、視細胞へと再び輸送されロドプシンと結合する。この視物質 11-*cis*-retinal 再生のためのビタミン A 代謝回路がレチノイドサイクルである。視覚を維持するために 11-*cis*-retinal は継続的に再生される必要があり、この視細胞—網膜色素上皮細胞間で営まれるレチノイド代謝経路は視覚に必須である。個々の分子異常が引き起こす網膜疾患を示している。LCA : Leber congenital amaurosis, CRALBP : cellular retinal binding protein, CRBP 1 : cellular retinoid binding protein 1.

によって外側膜に移転される¹⁾。ABCR 欠損マウスでは暗順応遅延と RPE 内にリポフスチン蓄積が観察され²⁾、ABCR の異常による N-ret-PE の移送遅延が加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) や Stargardt 病にみられるリポフスチン蓄積に関与することが示唆されている。

2. all-trans-retinal から all-trans-retinol へ

光受容により生じた all-trans-retinal は視細胞内の円板膜外側膜上で all-trans-retinol (ビタミン A) に還元される。この還元反応は NADPH 特異的な all-trans-retinol dehydrogenase (RDH 8, RDH 12) によって担われている。2000 年, Rattner らにより, 視細胞特異的な RDH 8 (別名 photoreceptor RDH: prRDH) が同定された³⁾。2005 年には, Maeda らにより RDH 8 欠損マウスの解析が行われ⁴⁾, all-trans-retinal の代謝遅延と暗順応遅延は観察されたものの, 網膜変性がみられないこと, また網膜変性患者に RDH 8 の遺伝子異常が見つかっていないことから, 2002 年に Haeseleer らにより網膜 all-trans-retinol dehydrogenase として同定された RDH 12 の重要性が提唱されるようになった⁵⁾。さらに, 2004 年には RDH 12 遺伝子異常が若年発症の網膜変性の原因になることが報告され^{6,7)}, RDH 12 が最重要な all-trans-retinol dehydrogenase と考えられるようになった。しかしながら, RDH 12 欠損マウスにおける網膜変化はヒト網膜症に比べて軽度であること^{8,9)}, all-trans-retinal 還元遅延が RDH 8 欠損マウスに比べて少ないこと⁸⁾, さらに RDH 8 と RDH 12 の重複欠損マウスを用いた研究から, レチノイドサイクルにおける all-trans-retinol dehydrogenase としては RDH 8 が約 70% の還元化を RDH 12 は約 30% の活性を担うことが明らかになった¹⁰⁾。これらの事実から RDH 12 はレチノイドサイクルを担う他に別の役割をもち, RDH 12 異常に伴う網膜変性はレチノイドサイクルとは別の役割欠損によって引き起こされることも示唆されている。しかし興味深いことは, RDH 8 と RDH 12 の重複欠損網膜は, 通常 98% 以上の all-trans-retinol dehydrogenase 活性を RDH 8 と RDH 12 両酵素で行っているにもかかわらず, *in vivo* での 11-cis-retinal の再生は依然観察され, 通常では 2% 以下の活性しかもたない他の RDH が RDH 8 と RDH 12 の両欠損を代償できる仕組みを備えていることが明らかになったことである¹⁰⁾。

3. 網膜色素上皮細胞 (RPE) への移送と貯蓄について

視細胞で産生された all-trans-retinol (ビタミン A) はレチノイド結合蛋白質 (cellular retinoid binding protein 1: CRBP 1 や interphotoreceptor retinoid binding protein: IRBP) により RPE へと運ばれる。特に IRBP は視細胞-RPE 間 matrix 内において最大発現量をもつ可溶性蛋白質の一つでレチノイド輸送における最重要の分子と考えられたが, 欠損マウスにおいてレチノイド輸送はまった

く障害されないことから¹¹⁾, 輸送における IRBP の役割は今も議論され続けている。IRBP は網膜発達にかかわること¹²⁾, またその強い抗原性¹³⁾ から網膜の生理機能を考えるうえで重要な分子であることに変わりはない。

RPE へと運ばれた all-trans-retinol は lecithin: retinol acyltransferase (LRAT) による retinyl palmitate とのエステル化反応により all-trans-retinyl ester に変換され, RPE 内に貯蓄される¹⁴⁾。All-trans-retinyl ester は自家蛍光を帯びていることが知られていて, この自家蛍光を利用した解析により, 2004 年 Imanishi らにより RPE 内に all-trans-retinyl ester を蓄積している細胞小器官である retinosome が発見された¹⁵⁾。視覚に必須であるビタミン A (all-trans-retinol) が, 眼内 (網膜色素上皮内) にどのように貯蓄されているのかはそれまで知られておらず, 網膜内のホメオスタシス維持の仕組みの一つとして注目されている。Retinosome を形成する分子の一つが adipose differentiation-related protein であることが分かっており, 肝臓におけるレチノイドを含めた脂肪貯蓄機序との類似性が示唆されている¹⁶⁾。また, retinosome は all-trans-retinyl ester の酸化を防止し, 網膜視細胞と RPE の環境を維持することにも関与していることが示唆されている。網膜特異的な蛋白質や脂肪の酸化物質が加齢黄斑変性患者網膜にみられることなどからも^{17)~19)}, 酸化反応を受けやすい不飽和長鎖脂肪酸を含む all-trans-retinyl ester を retinosome 内に貯留させる仕組みは合理的であるといえる。同時に retinosome 形成異常が 11-cis-retinal 再生障害を引き起こさないことが観察されている¹⁶⁾。この貯蓄型レチノイドである all-trans-retinyl ester を産生する LRAT を欠損したマウスでは all-trans-retinyl ester と 11-cis-retinal を完全に欠如している¹⁴⁾。

4. Isomerohydrolase 活性; all-trans-retinyl ester から 11-cis-retinol へ

all-trans-retinyl ester から 11-cis-retinol への反応には少なくとも 2 つの化学反応が必要である。all-trans-retinoid から 11-cis-retinoid への異性化である isomerase 反応とエステル化合物から脂肪酸を取り除く脱水反応; hydrolase 反応である。このステップに, RPE に多量に発現している retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa (RPE 65) が重要な役割を担っていることが長く示唆されていた。しかし, RPE 65 は膜蛋白質であり, *in vitro* における発現自体も困難であることからその機能が長く知られていなかった。2006 年, 3 つのグループから RPE 65 が単体で all-trans-retinyl ester から 11-cis-retinol に変換できることが示され, RPE 65 が単独で脱水反応と異性化反応を担っている isomerohydrolase であることが明らかになった^{20)~22)}。この脱水反応と異性化反応という 2 つの反応がどのように起こっているのかについては 2 つの仮説が挙げられている²³⁾²⁴⁾。

Carbocation 仮説とエステル脱水反応で生じるエネルギーを利用した反応仮説である。Carbocation の発生を阻害する目的から retinylamine を用いた 11-*cis*-retinol 産生抑制の試みがなされ、完全阻害することが確認されており、Carbocation 仮説の重要性が認められてきている²³⁾²⁵⁾。また、retinylamine は RPE 65 に直接結合し isomerohydrolase 活性を阻害することが明らかにされた²⁶⁾。RPE 65 欠損マウスは 11-*cis*-retinal を完全に欠如している²⁷⁾。

5. 11-*cis*-retinal への再生

RPE 65 により産生された 11-*cis*-retinol は 11-*cis*-retinal に再生されることによりロドプシンに結合し再利用される。この脱水素反応は RPE 内の 11-*cis*-retinol dehydrogenase により行われている。主要な 11-*cis*-retinol dehydrogenase は RDH 5 である。RPE 内で産生された 11-*cis*-retinal は cellular retinal binding protein (CRALBP) と結合し、再び視細胞へと輸送されロドプシンと結合する。RDH 5 欠損マウスでは 11-*cis*-retinal 産生遅延による暗順応遅延がみられる²⁸⁾。2002 年には RDH 11 が RPE に存在し、11-*cis*-retinol dehydrogenase 活性をもつことが⁵⁾、また 2005 年に視細胞での発現も報告された²⁹⁾。RDH 11 欠損マウスでは暗順応遅延がみられるもののその程度は非常に軽度であり、RDH 5 と RDH 11 の重複欠損マウスを用いることにより、RDH 11 が生体内で 11-*cis*-retinol dehydrogenase 活性をもつことが明らかになった³⁰⁾。また、ヒト RDH 5 変異でみられる白点状眼底 (fundus albipunctatus) と錐体変性が RDH 5 と RDH 11 の重複欠損マウスで認められ、錐体視細胞は桿体視細胞に比べて視物質欠損状態の影響を受けやすいことが示された³¹⁾。

III レチノイドサイクルと遺伝性網膜変性

視細胞外節と RPE にて行われる 11-*cis*-retinal の再生は視覚に必須であり、レチノイドサイクルにかかわる分子異常がさまざまな網膜変性疾患を引き起こすことがよく知られている (図 1)。現在までに、以下の分子異常が網膜変性疾患の原因として報告されている。

1. RPE 65 ; 遺伝子座 1p31.2

常染色体劣性遺伝で乳児期より重篤な網膜変性を呈する Leber congenital amaurosis (LCA) の 16%、常染色体劣性遺伝の網膜色素変性の 2% が RPE 65 変異により引き起こされていることが報告されている³²⁾³³⁾。Swedish Briard-Beagle イヌは RPE 65 自然変異をもつ網膜変性モデルイヌで、このイヌに初めて網膜変性の遺伝子治療が行われて良好な結果を得ている³⁴⁾。また、rd 12 マウスにおける網膜変性は RPE 65 遺伝子異常が原因であることも同定され、モデルイヌ同様に遺伝子治療の試みがなされている³⁵⁾。さらに Ali らのグループと Bennett らのグループにより RPE 65 異常をもつヒトへの遺伝子治

療が 2007 年に開始され、ごく最近、治療経過の第一報が報告された³⁶⁾³⁷⁾。

RPE 65 異常は視覚に必須な 11-*cis*-retinal を RPE 内でまったく誘導できないことから、不足している 11-*cis*-retinal を薬理学的に補充することにより視覚を回復させようとする試みもある。しかしながら、11-*cis*-retinal は光と温度に非常に不安定で、日常生活光と室温下では all-*trans*-isomer, 13-*cis*-isomer, retinol または retinoic acid へと代謝されてしまう³⁸⁾。これらのことから、製薬への製造や輸送中にも、厳密な遮光と温度管理が必要であり、11-*cis*-retinal 関連分子を補足するのは困難である。そこで、RPE 65 欠損マウスに人工アナログとしてより安定な 9-*cis*-retinal やその誘導体を投与することにより、網膜の機能と構造の両者の保存に成功している³⁹⁾⁴⁰⁾。これはロドプシンが 11-*cis*-retinal 以外に 9-*cis*-retinal を視物質として利用できることを応用した治療である。

RPE 65 欠損マウスでは RPE 内に大量の all-*trans*-retinyl ester の蓄積が認められ、また加齢に伴いその蓄積量が増大することが知られている⁴⁰⁾。RPE 65 欠損マウスは短縮した視細胞外節をもつが、加齢により大量の all-*trans*-retinyl ester が蓄積しても視細胞外節の形態を維持する²⁷⁾ことなどから大量の all-*trans*-retinyl ester 蓄積が網膜に悪影響を与えるのではないかと懸念は挙げられているものの、RPE 65 異常では単に 11-*cis*-retinal 欠損が網膜変性の原因と考えられている。

2. Lecithin : retinol acyltransferase (LRAT) ; 遺伝子座 4q32.1

常染色体劣性遺伝の Leber congenital amaurosis (LCA) と網膜色素変性の原因であることが報告されている⁴¹⁾。欧米網膜変性患者における LRAT 遺伝子異常の頻度は低いことも報告されている⁴²⁾。2005 年、Batten らにより LRAT 欠損マウスモデルにアデノウィルスを用いた遺伝子治療と RPE 65 変異マウスと同様に人工アナログ 9-*cis*-retinal を用いた薬物治療が試みられ、両治療法で網膜機能と構造の改善に著効することが報告された⁴³⁾。同時に早期治療の重要性が示され、現時点では遺伝子治療の補助療法として 9-*cis*-retinal を用いた薬物治療が用いられる可能性が議論されている。

腸管から吸収された all-*trans*-retinol (ビタミン A) はレチノイド結合蛋白質やアルブミンと結合し脈絡膜循環まで達するが、血中内の all-*trans*-retinol を眼組織内に移行させる機序は最近まで知られていなかった。2007 年に RPE 側に高発現している stimulated by retinoic acid gene 6 (STRA 6) が同定され、STRA 6 と LRAT を介して all-*trans*-retinol が RPE に取り込まれることが報告された⁴⁴⁾。これにより LRAT はビタミン A の RPE への移行と蓄積という 2 つの重要な役割を担っていることが明らかになってきている。

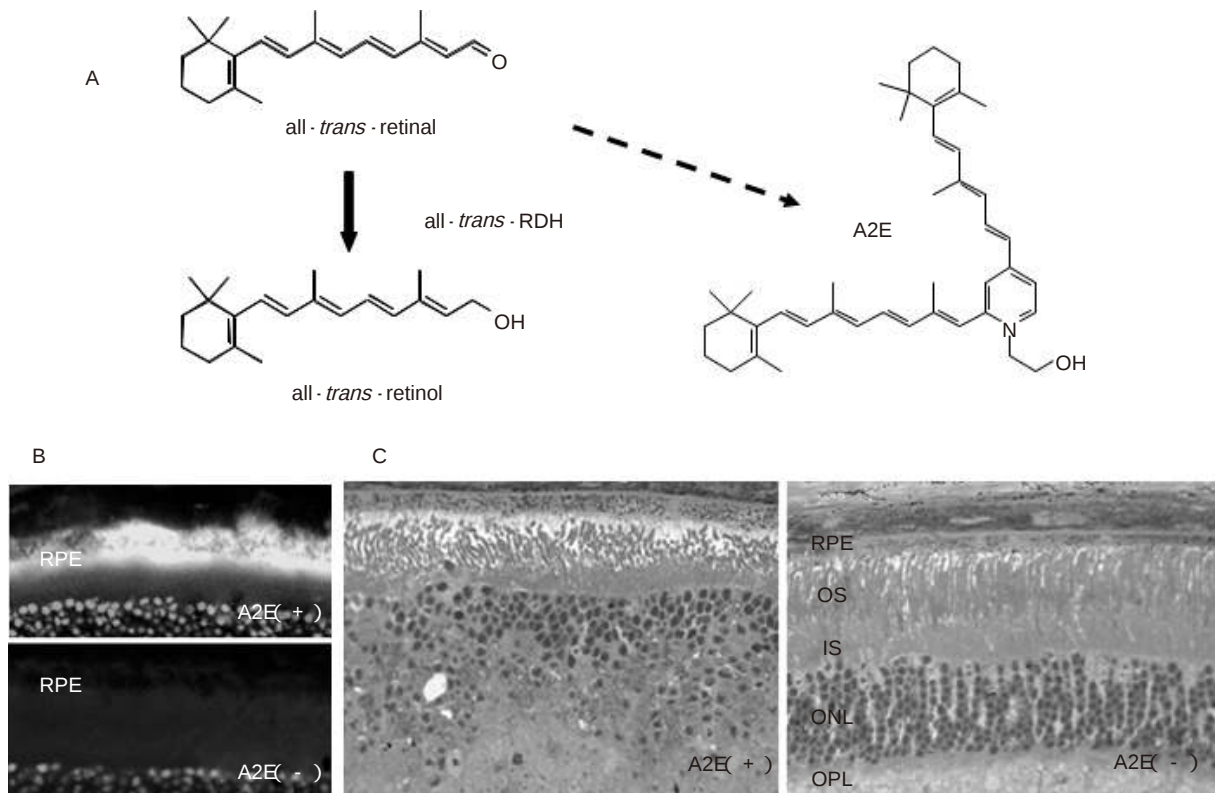


図 2 Pyridinium bisretinoid (A2E) 産生と網膜変性.

A : all-*trans*-retinal から all-*trans*-retinol への反応が遅延することにより 2 分子の all-*trans*-retinal が A2E を形成する。B : 網膜色素上皮細胞 (RPE) が視細胞外節を食食することにより A2E は網膜色素上皮細胞内に蓄積する。A2E は自家蛍光をもち蛍光顕微鏡により蓄積の状態を直接観察できる。C : A2E 蓄積眼において網膜変性が観察される。

OS : outer segment, IS : inner segment, ONL : outer nuclear layer, OPL : outer plexiform layer.

3. RDH 5 ; 遺伝子座 12q13.2

常染色体劣性遺伝の白点状眼底 (fundus albipunctatus) と錐体変性を引き起こすことが知られている^{45)~47)}。以前は白点状眼底は眼底に特徴的な白点をもち、高度な暗順応障害をもつ、固定性の疾患であると考えられていたが、患者の多くが 40 代以降に黄斑変性を引き起こすことが報告された⁴⁷⁾。RDH 5 欠損マウスにみられる所見はヒト RDH 5 活性欠損変異を持つ患者に比べ、非常に軽度であり暗順応の遅延がみられるのみであった²⁸⁾。そこで、RPE 内で 11-*cis*-retinol を 11-*cis*-retinal へと酸化する 11-*cis*-RDH に属する RDH 5 と RDH 11 の重複欠損マウスを用いた研究が試みられ、暗順応障害と錐体変性が 11-*cis*-retinal の再生遅延によって引き起こされることが分かった³¹⁾。さらに、RPE 内に蓄積される all-*trans*-retinyl ester とともに 13-*cis*-retinyl ester が大量に検出され、ヒト眼底で観察される白点との関連性が示唆されている⁴⁸⁾。このように 11-*cis*-RDH 変異による網膜障害は 11-*cis*-retinal 再生遅延によることが明らかになり、RPE 65 や LRAT 異常に伴う 11-*cis*-retinal 再生欠損の場合と同様に、人工アナログとしての 9-*cis*-retinal 投与の有効性が考えられた。実際に 11-*cis*-RDH 欠損マウスへの 9-*cis*-retinal 投与は暗順応障害と錐体変性の両者

を改善できることが報告され、今後臨床への応用が期待されている³¹⁾。

4. RDH 12 ; 遺伝子座 14q24.1

常染色体劣性遺伝の Leber congenital amaurosis (LCA) の 4% を担うことが報告されている⁶⁾⁷⁾。また、他の網膜色素変性、錐体変性をはじめとする若年性の網膜変性を引き起こすことも報告されている⁶⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾。11-*cis*-RDH に属する RDH 5 とは異なり、all-*trans*-RDH に属する RDH 12 異常に伴う網膜変性は若年発症であり、重度の網膜変性を示すことが報告されている⁵¹⁾。上述のようなレチノイドサイクルにかかわる分子の異常と同様に、11-*cis*-retinal 再生の遅延が網膜変性にかかわることが *in vitro* の研究で示唆されていたが⁵¹⁾、RDH 12 欠損マウスを用いた *in vivo* の研究では逆に 11-*cis*-retinal 再生の亢進がみられ、レチノイドサイクルの異常亢進による光傷害が網膜変性の一因であることが示唆されている⁸⁾ (サイクル亢進と網膜光傷害については IV-3 を参照)。また細胞レベルでの研究から、all-*trans*-RDH 活性低下による細胞内での all-*trans*-retinal 蓄積が、retinoic acid の産生に関与し、光受容時の retinoic acid 産生も病因の一つとして挙げられている⁵²⁾。さらに興味深いことには、RDH 12 異常では all-*trans*-retinal から all-*trans*-

retinol への反応が阻害されることから視細胞内での all-*trans*-retinal 蓄積により、2 分子の all-*trans*-retinal と網膜内に豊富に存在するエタノールアミン (phosphatidylethanolamine : PE) が結合することにより形成される網膜傷害物質である pyridinium bisretinoid (A2E) 産生が病因の一つとして注目されている⁴⁾¹⁰⁾ (図 2). A2E はリポフスチンの主要成分であり、加齢により RPE 内に蓄積することが知られている⁵³⁾.

5. ABCA 4 ; 遺伝子座 1p22.1

網膜内の ATP-binding cassette transporter (ABCR) は ABCA 4 遺伝子によってコードされており、ABCA 4 変異が Stargardt 病の原因遺伝子の一つとして報告されている⁵⁴⁾⁵⁵⁾. また、加齢黄斑変性の一部がこの ABCA 4 変異により発症することも示唆されている⁵⁶⁾. ABCR は比較的大きな分子 (分子量 210 kDa) で cDNA 配列も 7,500 塩基を超える。多くのポリモルフィズムが報告されており⁵⁷⁾⁵⁸⁾, それらが ABCR 活性にどのような影響を与えているのかが今後の研究課題の一つでもある。2 つの ATP 結合ドメインと長い細胞質内ループから構成されている ABCR は、ロドプシンから all-*trans*-retinal が円板膜内側膜に放出された場合にそれを外側膜に移送する役目を担っており、移送異常により all-*trans*-retinal が円板膜内に停留し視細胞内のエタノールアミンと結合し、網膜傷害物質 A2E を産生することが病因として注目されている¹⁾²⁾⁵⁹⁾ (図 2). ABCR 欠損マウスでは RPE 内での A2E 蓄積とリポフスチン顆粒の蓄積が観察されるが²⁾, 実験マウスの寿命に近い 1 年 6 か月齢においても網膜変性は観察されない⁶⁰⁾. このような違いはマウスではヒトでみられるような黄斑が存在しないなど解剖学的な差異や、マウスにおける網膜変性の表現型はヒトに比べて弱いということなどが考えられる。そこで、ABCR 異常にみられるような all-*trans*-retinal の蓄積という特徴を強化するため、マウスにおける主要な all-*trans*-retinol dehydrogenase である RDH 8 と ABCR の重複欠損マウスを作製したところ、加齢黄斑変性に特徴的な A2E 蓄積、補体沈着、Bruch 膜肥厚、網膜色素上皮細胞変性、視細胞変性、脈絡膜新生血管を伴う網膜変性が観察された⁶¹⁾. このモデルマウスが加齢黄斑変性の病態解明と治療法開発につながることを期待されている。

6. Cellular retinal binding protein (CRALBP) ; 遺伝子座 15q26.1

常染色体劣性遺伝の網膜色素変性の原因遺伝子の一つである⁶²⁾. CRALBP は retinal と特異的に結合する分子で、11-*cis*-retinal の RPE から視細胞への輸送に関与している。遺伝子欠損マウスでは暗順応遅延と過剰光条件下での進行性網膜変性が観察されている⁶³⁾. 11-*cis*-retinal 輸送障害によるロドプシン再生遅延が直接の網膜障害の原因であると考えられている。

IV レチノイドサイクル異常に対する治療の試み

レチノイドサイクル内の 2 つの反応がそれぞれ唯一の酵素により営まれている。all-*trans*-retinol (ビタミン A) から蓄積型の all-*trans*-retiny ester への LRAT によるエステル化と、all-*trans*-retiny ester から 11-*cis*-retinol への RPE 65 による反応である。これらの遺伝子欠損マウスでは視物質 11-*cis*-retinal の産生が完全に阻害され、視覚応答は完全に欠如している¹⁴⁾²⁷⁾. これらの遺伝子異常による網膜変性患者は若年発症の網膜変性を呈すが、変性早期には網膜組織の形態が保たれており治療の可能性が示唆されている⁶⁴⁾.

また、レチノイドサイクル代謝速度の亢進が網膜毒性物質である A2E 産生と網膜光傷害に関与することが示唆されており、サイクル速度を調整することの重要性が知られてきている。

1. 遺伝子治療

自然発症の RPE 65 遺伝子異常によるイヌモデルを用いた遺伝子治療の有効性が 2001 年にペンシルベニア大学 Bennett らのグループにより報告された³⁴⁾. その後、RPE 65 遺伝子欠損マウスに対する遺伝子治療が盛んに行われ、その有用性が確認されている⁶⁵⁾⁶⁶⁾. 2005 年には、LRAT 遺伝子欠損マウスに対する遺伝子治療とその効果の検討が行われている⁴³⁾. レチノイドサイクル内の 2 つの反応は RPE 65 と LRAT がそれぞれ単独で担っており、それら酵素反応欠損を引き起こす遺伝子変異はサイクルを完全に停止させてしまい、その結果 Leber congenital amourosis (LCA) をはじめとする重篤な網膜変性疾患の原因になっている。同時にこれら網膜特異的な分子は強力な酵素活性をもち、少量の蛋白質発現でも十分に眼内における酵素反応を代償することができるという利点がある。実際の動物モデルを用いた治療でも遺伝子発現は網膜下注射をした部分に限定され、発現量も野生型動物の 10 分の 1 以下である場合が多い。2007 年には RPE 65 変異をもつ LCA 患者への遺伝子治療が開始され、ごく最近、その治療経過に関する第一報が報告された。米国で行われた Bennett らの治療では、17~23 歳の 3 人の RPE 65 遺伝子異常を持つ患者に対し、硝子体手術による黄斑下へのアデノ随伴ベクターの投与が行われ、そのうち 1 名の患者において視機能の改善がみられた³⁷⁾. 同疾患での Ali らのイギリスでの遺伝子治療では明確な治療効果はみられなかったものの、治療後 6 か月の観察期間中、副作用は観察されていない³⁶⁾. 長期観察による遺伝子治療の安全性とその治療効果が現在注目されている。

2. レチノイドアナログによる治療

通常ロドプシンは 11-*cis*-retinal を視物質として利用するが、9-*cis*-retinal を利用しイソロドプシンを形成し

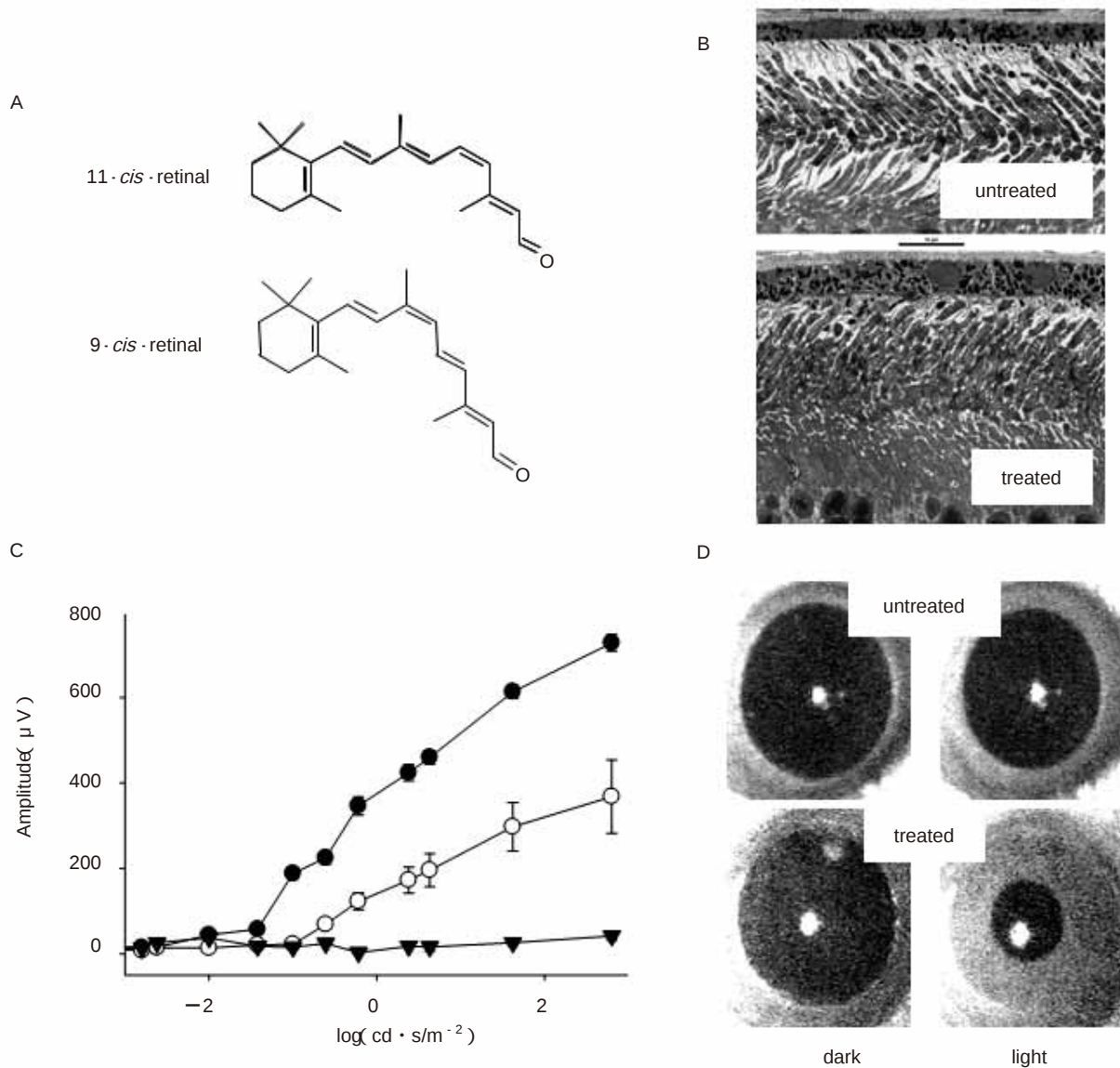


図 3 視物質アナログ 9-*cis*-retinal を用いた LRAT 欠損マウスに対する薬物治療。

A : 11-*cis*-retinal と 9-*cis*-retinal の構造。B : 視物質アナログ 9-*cis*-retinal を用いた薬物治療にて LRAT 欠損マウス網膜構造が保たれている。C : 網膜電図(ERG)検査において 9-*cis*-retinal 投与を行った LRAT 欠損マウスは視細胞機能改善が認められる。● : *Lrat*^{+/+}, ○ : *Lrat*^{-/-} + 9-*cis*-retinal, ▼ : *Lrat*^{-/-} D : 9-*cis*-retinal 投与を行った LRAT 欠損マウスでは対光反射の改善もみられる。

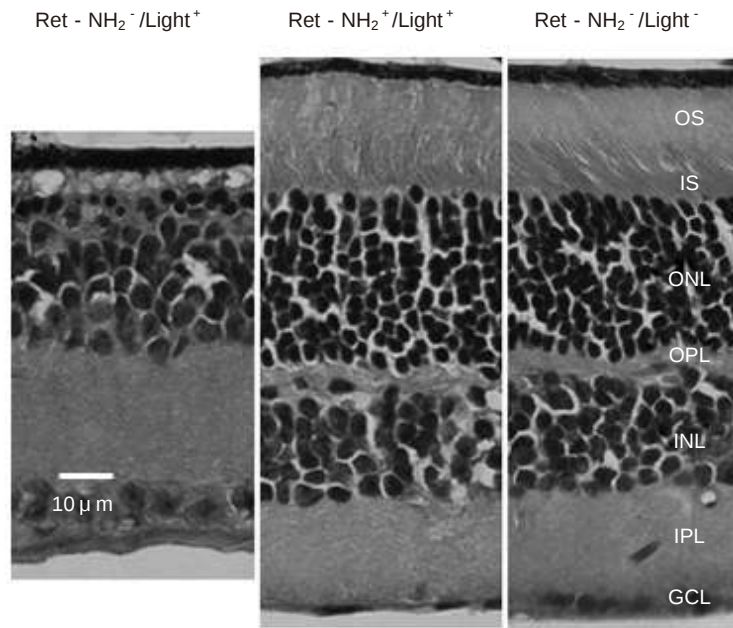
光感受することができる(図 3 A)。9-*cis*-retinal のロドプシンに対する親和性は 11-*cis*-retinal に劣るため、仮に内因性の 11-*cis*-retinal 産生があれば健全な 11-*cis*-retinal とロドプシンの結合を阻害することはない⁶⁷⁾。2000 年に Palczewski グループが RPE 65 遺伝子欠損マウスに対して、さまざまな 9-*cis*-retinal の誘導体を用いた薬物治療を試み、良好な結果を得ている³⁹⁾⁴⁰⁾。経口投与された 9-*cis*-retinal がロドプシンと結合していることが生化学的にも証明され⁶⁸⁾、網膜機能検査である網膜電図(ERG)上での改善、また高次視機能を反映する瞳孔対光反射の改善も確認されている。さらに、LRAT 遺伝子欠損マウスに対して薬物治療と遺伝子治療の治療効果の比較検討も行っている⁴³⁾(図 3 B~D)。マウスモデル

においては、遺伝子治療と薬物治療のどちらにおいても同程度の機能と形態の回復が観察されたが、将来臨床においてどちらの治療を選択するかは、患者の年齢や網膜変性の重症度、同定された遺伝子配列異常が重要な要素になることが明らかで、今後さらにメディカルレチナの重要性が高まることが予想される。現在、9-*cis*-retinal を用いた薬物治療のさらなる前臨床試験において投与法の改良が行われており、近く臨床試験が行われる予定である。

3. レチノイドサイクル阻害剤の発見と治療への応用

視物質ロドプシンは視覚に必須な分子であり、その再生、活性化、また活性の制御機構は網膜生理学上においても大変重要で、これらの異常は網膜変性に深く関与

A



B

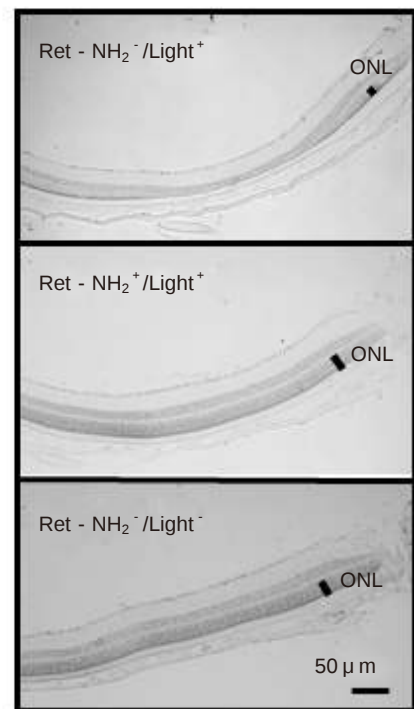


図 4 Retinylamine による網膜光傷害の抑制。

光照射 (5,000 ルクス 2 時間照射) 前に retinylamine (Ret-NH₂) を 1 mg 経口投与することにより重度の網膜光傷害を予防することができる。A: 光傷害を受けたマウス下方網膜像の拡大図。B: 光傷害を受けたマウス下方網膜の全体像。INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer。

している。ロドプシンの活性化(構造変化)はそのシグナルの下流にある GTP 結合蛋白質であるトランスデューシンを活性化させ、一連のカスケード反応を惹起し、視細胞形質膜上のカチオンチャンネルが閉じることにより、電気信号が発生するしくみになっている⁶⁹⁾。しかしながら、長時間にわたる過剰な光刺激によりトランスデューシン活性が亢進すると、カスケード反応を担う分子の均衡が崩壊し網膜光傷害といわれる網膜変性を引き起こすことが知られている⁷⁰⁾⁷¹⁾。このトランスデューシン活性はロドプシンの再生量と緊密な関係にあることも同時に報告されており、ロドプシン再生を支援するレチノイドサイクルの代謝亢進は視細胞光傷害に強く関与している⁷¹⁾⁷²⁾。また、トランスデューシン活性によらず、ロドプシン再生量自体が光傷害の感受性に影響しているという報告もある⁷²⁾。このためサイクルの代謝速度を調整することにより視細胞光傷害を防ぐことが試みられている。

Sieving らは、重症のニキビ治療薬として 13-*cis*-retinoic acid 使用中に夜盲を訴えることに注目し、13-*cis*-retinoic acid がレチノイドサイクル反応を抑制していることを確認し、マウスにおいて 13-*cis*-retinoic acid が視細胞光傷害を防ぐことを観察している⁷³⁾。しかしながら、13-*cis*-retinoic acid は催奇形性などの副作用があり、実際に網膜内の cDNA 発現を過剰に変動させることも確

認され⁶⁷⁾、網膜症治療への使用は回避されている。

光傷害の他に、サイクル亢進による有害物質 pyridinium bisretinoid (A2E) 産生の増加が、視細胞傷害を引き起こしている事実も存在する(図 2)。A2E は 2 分子の all-*trans*-retinal と網膜内に豊富に存在するエタノールアミンが視細胞内で結合し、RPE による視細胞外節の貪食作用により、RPE 内で代謝されることにより生じるが、A2E 蓄積が Stargardt 病や加齢黄斑変性患者に認められ病因の一つと考えられている⁷⁴⁾。A2E の網膜への傷害機序については、さまざまな研究が施行されており、酸化物質による直接傷害や補体経路の活性化などが示唆されている⁷⁴⁾。Travis らのグループは A2E 蓄積が報告されている ABCA4 欠損マウスを用いた研究から、13-*cis*-retinoic acid⁷⁵⁾とこれとは別に抗癌剤である Fenretinide が A2E の蓄積予防に効果があることを報告している⁷⁶⁾。Fenretinide も使用患者が夜盲を訴えることからサイクルの速度調整への関与が示唆された薬剤である。同グループによる研究から、Fenretinide はレチノイド輸送蛋白質への all-*trans*-retinol (ビタミン A) 結合を阻害し、網膜内でのレチノイド減少が夜盲にかかわることを解明している⁷⁶⁾。

2005 年、Golczak らは異性化反応(all-*trans*-retinol から 11-*cis*-retinol の産生)を阻害する分子として retinylamine を開発した²³⁾。Retinylamine は *in vivo*, *in*

vitro の両者で稼動できる特異的な 11-*cis*-retinol 産生を抑制するレチノイドサイクル阻害剤として重要であることが報告された²³⁾²⁵⁾²⁶⁾。また, retinylamine が光傷害に有効な治療薬であること(図 4)をはじめ網膜変性疾患に重要な役割を担うことが明らかにされている¹⁰⁾²⁶⁾⁶¹⁾。Retinylamine は可逆的かつ効率的なレチノイドサイクル阻害剤であり, 毒性も低いことが実験的に証明されていることから⁶⁷⁾, 光傷害(大部分の遺伝性網膜変性疾患)と A2E 産生が関与する網膜変性疾患(Stargardt 病や加齢黄斑変性; 特に萎縮性加齢黄斑変性)への有力な治療薬として注目されている。

V ま と め

網膜変性疾患を含めた神経変性症の大部分は未だ治療法が確立していないのが現状である。しかしここに述べたように, レチノイドサイクルにかかわる分子異常に伴う網膜変性疾患は, サイクル内の各反応の基礎研究から網膜内におけるビタミン A 代謝機序が明らかになり, 一部の遺伝性網膜変性疾患(網膜色素変性症, LCA, Stargardt 病など), 加齢黄斑変性, 視細胞光傷害の発症メカニズムが解明され, それら治療法の開発が急速に進んでいる。近い将来, 臨床現場でこれら治療法が試されることが確実視されている。眼科疾患治療のためにも, 詳細な基礎研究による病態解明と病態に応じた治療法の開発, またその理解が不可欠である。

レチノイドサイクルにかかわる基礎研究をご指導くださっている Krzysztof Palczewski 教授(Case Western Reserve University, Cleveland OH)に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Molday RS : ATP-binding cassette transporter ABCA4 : molecular properties and role in vision and macular degeneration. *J Bioenerg Biomembr* 39 : 507—17, 2007.
- 2) Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH : Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* 98 : 13—23, 1999.
- 3) Rattner A, Smallwood PM, Nathans J : Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol. *J Biol Chem* 275 : 11034—11043, 2000.
- 4) Maeda A, Maeda T, Imanishi Y, Kuksa V, Alekseev A, Bronson JD, et al : Role of photoreceptor-specific retinol dehydrogenase in the retinoid cycle *in vivo*. *J Biol Chem* 280 : 18822—18832, 2005.
- 5) Haeseleer F, Jang GF, Imanishi Y, Driessen CA, Matsumura M, Nelson PS, et al : Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J Biol Chem* 277 : 45537—45546, 2002.
- 6) Janecke AR, Thompson DA, Utermann G, Becker C, Hubner CA, Schmid E, et al : Mutations in RDH 12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 36 : 850—854, 2004.
- 7) Perrault I, Hanein S, Gerber S, Barbet F, Ducroq D, Dollfus H, et al : Retinal dehydrogenase 12 (RDH 12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 75 : 639—646, 2004.
- 8) Maeda A, Maeda T, Imanishi Y, Sun W, Jastrzebska B, Hatala DA, et al : Retinol dehydrogenase (RDH 12) protects photoreceptors from light-induced degeneration in mice. *J Biol Chem* 281 : 37697—37704, 2006.
- 9) Kurth I, Thompson DA, Ruther K, Feathers KL, Chrispell JD, Schroth J, et al : Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene *Rdh 12* does not limit visual cycle function. *Mol Cell Biol* 27 : 1370—1379, 2007.
- 10) Maeda A, Maeda T, Sun W, Zhang H, Baehr W, Palczewski K : Redundant and unique roles of retinol dehydrogenases in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 19565—19570, 2007.
- 11) Palczewski K, Van Hooser JP, Garwin GG, Chen J, Liou GI, Saari JC : Kinetics of visual pigment regeneration in excised mouse eyes and in mice with a targeted disruption of the gene encoding interphotoreceptor retinoid-binding protein or arrestin. *Biochemistry* 38 : 12012—12019, 1999.
- 12) Gonzalez-Fernandez F, Healy JI : Early expression of the gene for interphotoreceptor retinoid-binding protein during photoreceptor differentiation suggests a critical role for the interphotoreceptor matrix in retinal development. *J Cell Biol* 111 : 2775—2784, 1990.
- 13) Chan CC, Nussenblatt RB, Wiggert B, Redmond TM, Fujikawa LS, Chader GJ, et al : Immunohistochemical analysis of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) in the rat. *Immunol Invest* 16 : 63—74, 1987.
- 14) Batten ML, Imanishi Y, Maeda T, Tu DC, Moise AR, Bronson D, et al : Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem* 279 : 10422—10432, 2004.
- 15) Imanishi Y, Batten ML, Piston DW, Baehr W, Palczewski K : Noninvasive two-photon imaging reveals retinyl ester storage structures in the eye. *J Cell Biol* 164 : 373—383, 2004.
- 16) Imanishi Y, Sun W, Maeda T, Maeda A, Palczewski K : Retinyl Ester Homeostasis in the Adipose

- Differentiation-related Protein-deficient Retina. *J Biol Chem* 283 : 25091—25102, 2008.
- 17) **Gu X, Meer SG, Miyagi M, Rayborn ME, Hollyfield JG, Crabb JW**, et al : Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 278 : 42027—42035, 2003.
 - 18) **Ebrahim Q, Renganathan K, Sears J, Vasanji A, Gu X, Lu L**, et al : Carboxyethylpyrrole oxidative protein modifications stimulate neovascularization : Implications for age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 13480—13484, 2006.
 - 19) **Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H**, et al : Drusen proteome analysis : an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 14682—14687, 2002.
 - 20) **Jin M, Li S, Moghrabi WN, Sun H, Travis GH** : Rpe 65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* 122 : 449—459, 2005.
 - 21) **Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma JX** : RPE 65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 12413—12418, 2005.
 - 22) **Redmond TM, Poliakov E, Yu S, Tsai JY, Lu Z, Gentleman S** : Mutation of key residues of RPE 65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 13658—13663, 2005.
 - 23) **Golczak M, Kuksa V, Maeda T, Moise AR, Palczewski K** : Positively charged retinoids are potent and selective inhibitors of the trans-cis isomerization in the retinoid (visual) cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 8162—8167, 2005.
 - 24) **Rando RR** : Membrane phospholipids as an energy source in the operation of the visual cycle. *Biochemistry* 30 : 595—602, 1991.
 - 25) **Golczak M, Imanishi Y, Kuksa V, Maeda T, Kubota R, Palczewski K** : Lecithin : retinol acyltransferase is responsible for amidation of retinylamine, a potent inhibitor of the retinoid cycle. *J Biol Chem* 280 : 42263—42273, 2005.
 - 26) **Golczak M, Maeda A, Bereta G, Maeda T, Kiser P, Hunzelmann S**, et al : Metabolic basis of visual cycle inhibition by retinoid and non-retinoid compounds in the vertebrate retina. *J Biol Chem*, 2008.
 - 27) **Redmond TM, Yu S, Lee E, Bok D, Hamasaki D, Chen N**, et al : Rpe 65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet* 20 : 344—351, 1998.
 - 28) **Driessen CA, Winkens HJ, Hoffmann K, Kuhlmann LD, Janssen BP, Van Vugt AH**, et al : Disruption of the 11-cis-retinol dehydrogenase gene leads to accumulation of cis-retinols and cis-retinyl esters. *Mol Cell Biol* 20 : 4275—4287, 2000.
 - 29) **Kasus-Jacobi A, Ou J, Birch DG, Locke KG, Shelton JM, Richardson JA**, et al : Functional characterization of mouse RDH 11 as a retinol dehydrogenase involved in dark adaptation *in vivo*. *J Biol Chem* 280 : 20413—20420, 2005.
 - 30) **Kim TS, Maeda A, Maeda T, Heinlein C, Kedishvili N, Palczewski K**, et al : Delayed dark adaptation in 11-cis-retinol dehydrogenase-deficient mice : a role of RDH 11 in visual processes *in vivo*. *J Biol Chem* 280 : 8694—8704, 2005.
 - 31) **Maeda A, Maeda T, Palczewski K** : Improvement in rod and cone function in mouse model of Fundus albipunctatus after pharmacologic treatment with 9-cis-retinal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 4540—4546, 2006.
 - 32) **Marlhens F, Bareil C, Griffioen JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C**, et al : Mutations in RPE 65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 17 : 139—141, 1997.
 - 33) **Thompson DA, Gal A** : Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium : genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res* 22 : 683—703, 2003.
 - 34) **Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV**, et al : Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28 : 92—95, 2001.
 - 35) **Pang JJ, Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Li J**, et al : Retinal degeneration 12 (rd 12) : a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Mol Vis* 11 : 152—162, 2005.
 - 36) **Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K**, et al : Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358 : 2231—2239, 2008.
 - 37) **Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J**, et al : Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358 : 2240—2248, 2008.
 - 38) **Moise AR, Noy N, Palczewski K, Blanner WS** : Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry* 46 : 4449—4458, 2007.
 - 39) **Van Hooser JP, Aleman TS, He YG, Cideciyan AV, Kuksa V, Pittler SJ**, et al : Rapid restoration of visual pigment and function with oral retinoid in a mouse model of childhood blindness. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 8623—8628, 2000.
 - 40) **Van Hooser JP, Liang Y, Maeda T, Kuksa V, Jang GF, He YG**, et al : Recovery of visual functions in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *J Biol Chem* 277 : 19173—19182, 2002.
 - 41) **Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA**, et al : Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 28 : 123—124, 2001.
 - 42) **Sweeney MO, McGee TL, Berson EL, Dryja TP** : Low prevalence of lecithin retinol acyltransferase

- mutations in patients with Leber congenital amaurosis and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 13 : 588—593, 2007.
- 43) **Batten ML, Imanishi Y, Tu DC, Doan T, Zhu L, Pang J**, et al : Pharmacological and rAAV gene therapy rescue of visual functions in a blind mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS Med* 2 : e 333, 2005.
 - 44) **Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P**, et al : A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315 : 820—825, 2007.
 - 45) **Yamamoto H, Simon A, Eriksson U, Harris E, Berson EL, Dryja TP** : Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat Genet* 22 : 188—191, 1999.
 - 46) **Niwa Y, Kondo M, Ueno S, Nakamura M, Terasaki H, Miyake Y** : Cone and rod dysfunction in fundus albipunctatus with RDH 5 mutation : an electrophysiological study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1480—1485, 2005.
 - 47) **Nakamura M, Hotta Y, Tanikawa A, Terasaki H, Miyake Y** : A high association with cone dystrophy in Fundus albipunctatus caused by mutations of the RDH 5 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3925—3932, 2000.
 - 48) **Maeda A, Maeda T, Imanishi Y, Golczak M, Moise AR, Palczewski K** : Aberrant metabolites in mouse models of congenital blinding diseases : formation and storage of retinyl esters. *Biochemistry* 45 : 4210—4219, 2006.
 - 49) **Sun W, Gerth C, Maeda A, Lodowski DT, Van Der Kraak L, Saperstein DA**, et al : Novel RDH 12 mutations associated with Leber congenital amaurosis and cone-rod dystrophy : Biochemical and clinical evaluations. *Vision Res* 47 : 2055—2066, 2007.
 - 50) **Schuster A, Janecke AR, Wilke R, Schmid E, Thompson DA, Utermann G**, et al : The phenotype of early-onset retinal degeneration in persons with RDH 12 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1824—1831, 2007.
 - 51) **Thompson DA, Janecke AR, Lange J, Feathers KL, Hubner CA, McHenry CL**, et al : Retinal degeneration associated with RDH 12 mutations results from decreased 11-cis retinal synthesis due to disruption of the visual cycle. *Hum Mol Genet* 14 : 3865—3875, 2005.
 - 52) **Lee SA, Belyaeva OV, Popov IK, Kedishvili NY** : Overproduction of bioactive retinoic acid in cells expressing disease-associated mutants of retinol dehydrogenase 12. *J Biol Chem* 282 : 35621—35628, 2007.
 - 53) **Yannuzzi LA, Ober MD, Slakter JS, Spaide RF, Fisher YL, Flower RW**, et al : Ophthalmic fundus imaging : today and beyond. *Am J Ophthalmol* 137 : 511—524, 2004.
 - 54) **Martinez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del Rio T, Dean M**, et al : Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat Genet* 18 : 11—12, 1998.
 - 55) **Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A**, et al : A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 15 : 236—246, 1997.
 - 56) **Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS**, et al : Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 277 : 1805—1807, 1997.
 - 57) **Webster AR, Heon E, Lotery AJ, Vandenburgh K, Casavant TL, Oh KT**, et al : An analysis of allelic variation in the ABCA 4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1179—1189, 2001.
 - 58) **Fuse N, Suzuki T, Wada Y, Yoshida M, Shimura M, Abe T**, et al : Molecular genetic analysis of ABCR gene in Japanese dry form age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol* 44 : 245—249, 2000.
 - 59) **Sun H, Smallwood PM, Nathans J** : Biochemical defects in ABCR protein variants associated with human retinopathies. *Nat Genet* 26 : 242—246, 2000.
 - 60) **Mata NL, Tzekov RT, Liu X, Weng J, Birch DG, Travis GH** : Delayed dark-adaptation and lipofuscin accumulation in *abcr*^{+/-} mice : implications for involvement of ABCR in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1685—1690, 2001.
 - 61) **Maeda A, Maeda T, Golczak M, Palczewski K** : Retinopathy in mice induced by disrupted all-trans-retinal clearance. *J Biol Chem* 283 : 26684—26693, 2008.
 - 62) **Maw MA, Kennedy B, Knight A, Bridges R, Roth KE, Mani EJ**, et al : Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 17 : 198—200, 1997.
 - 63) **Saari JC, Nawrot M, Kennedy BN, Garwin GG, Hurley JB, Huang J**, et al : Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron* 29 : 739—748, 2001.
 - 64) **Jacobson SG, Aleman TS, Cideciyan AV, Sumaroka A, Schwartz SB, Windsor EA**, et al : Identifying photoreceptors in blind eyes caused by RPE 65 mutations : Prerequisite for human gene therapy success. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 6177—6182, 2005.
 - 65) **Narfstrom K, Katz ML, Ford M, Redmond TM, Rakoczy E, Bragadottir R** : *In vivo* gene therapy in young and adult RPE 65^{-/-} dogs produces long-term visual improvement. *J Hered* 94 : 31—37, 2003.

- 66) **Lai CM, Yu MJ, Brankov M, Barnett NL, Zhou X, Redmond TM**, et al : Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe 65^{-/-} knockout mouse eye results in limited rescue. *Genet Vaccines Ther* 2 : 3, 2004.
 - 67) **Maeda A, Maeda T, Golczak M, Imanishi Y, Leahy P, Kubota R**, et al : Effects of potent inhibitors of the retinoid cycle on visual function and photoreceptor protection from light damage in mice. *Mol Pharmacol* 70 : 1220—1229, 2006.
 - 68) **Maeda T, Maeda A, Leahy P, Saperstein D, Palczewski K** : Effects of long-term administration of 9-cis-retinyl acetate on visual function in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008(in press).
 - 69) **Palczewski K** : G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem* 75 : 743—767, 2006.
 - 70) **Maeda T, Imanishi Y, Palczewski K** : Rhodopsin phosphorylation : 30 years later. *Prog Retin Eye Res* 22 : 417—434, 2003.
 - 71) **Jacobson SG, McInnes RR** : Blinded by the light. *Nat Genet* 32 : 215—216, 2002.
 - 72) **Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Yu S, Redmond TM, Reme CE** : Protection of Rpe 65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 25 : 63—66, 2000.
 - 73) **Sieving PA, Chaudhry P, Kondo M, Provenzano M, Wu D, Carlson TJ**, et al : Inhibition of the visual cycle *in vivo* by 13-cis retinoic acid protects from light damage and provides a mechanism for night blindness in isotretinoin therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 1835—1840, 2001.
 - 74) **Rattner A, Nathans J** : Macular degeneration : recent advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurosci* 7 : 860—872, 2006.
 - 75) **Radu RA, Mata NL, Nusinowitz S, Liu X, Sieving PA, Travis GH** : Treatment with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt's macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 4742—4747, 2003.
 - 76) **Radu RA, Han Y, Bui TV, Nusinowitz S, Bok D, Lichter J**, et al : Reductions in serum vitamin A arrest accumulation of toxic retinal fluorophores : a potential therapy for treatment of lipofuscin-based retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 4393—4401, 2005.
-