
 総 説

レーベル病の遺伝子診断の試み

荒 文乃*, 堀田 喜裕*, 早川むつ子*, 築島 謙次**, 金井 淳*, 藤木 慶子*

*順天堂大学医学部眼科学教室, **国立リハビリテーションセンター眼科

要 約

Wallace らにより, レーベル病に特異性が高いミトコンドリア DNA (mtDNA) の11778番塩基対の点突然変異が発見されてから, レーベル病にこの点突然変異が高頻度に認められることが次々と報告されている. 私達は polymerase chain reaction 法によるレーベル病の診断の有用性についてすでに報告したが, 本稿では, 検討した4症例共に11778番塩基対の点突然変異を持ち, うち1症例はこのDNA診断によってレーベル病と診断することができた. また他の視神経疾患および正常者ではこの点突然変異は見られず, DNA診断は本疾患に有用であることを示した. しかし, 有効な治療法のない現在, 男性患者に対しては, 突然変異が子孫に伝わることはないということが出来るが, この突然変異をほぼ100%子孫に伝える女性保因者および女性患者に如何に対応するかという問題が残る等, 今までの結果をまとめ, DNA診断が臨床に与える意義, 問題点をあげ, 本疾患の原因について考察を加えた. (日眼会誌 95: 715-720, 1991)

 キーワード: レーベル病, ミトコンドリア DNA, DNA 診断

A Trial of Molecular Diagnosis in Leber's Optic Neuropathy

 Fumino Ara*, Yoshihiro Hotta*, Mutsuko Hayakawa*,
 Kenji Yanashima**, Atsushi Kanai* and Keiko Fujiki*

*Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

**Eye Clinic, National Rehabilitation Center

Abstract

The high frequency of mitochondrial DNA mutation at the nucleotide position (nt) 11,778 was reported in cases of Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) after the first report by Wallace et al.. We already reported that it provided a simple diagnostic test by means of PCR (polymerase chain reaction). We analyzed 3 definite cases of LHON, detected nt 11,778 mutation and determined the diagnosis of LHON in a case. No nt 11,778 mutation was found in patients with the other optic nerve diseases and in normal controls. This shows the usefulness of molecular diagnosis in LHON. Problems of genetic counselling for patients and female carriers and the possibilities to clarify the cause of LHON were discussed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 715-720, 1991)

 Key words: Leber's hereditary optic neuropathy, Mitochondrial DNA, DNA diagnosis

 別刷請求先: 113 文京区本郷3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 堀田 喜裕
 (平成3年4月5日受付, 平成3年5月28日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshihiro Hotta, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine.

3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku 113, Japan

(Received April 5, 1991 and accepted in revised form May 28, 1991)

I はじめに

レーベル病は急激な視力低下で発症し、時期の差はあっても両眼の視神経萎縮へと進行する遺伝性視神経疾患である。Theodor Leber¹⁾が5家系18症例を遺伝性の視神経疾患として報告してからすでに100年以上たつが、その病気の本体はいまだ不明である。遺伝形式は、多くの研究者による家系資料の集積により、母親を介する細胞質遺伝が考えられている^{2)~4)}。遺伝子の本体はDNAで、真核生物では核に存在するが、細胞質中のミトコンドリアにも少量存在する。このミトコンドリアDNA (mtDNA) は細胞質遺伝をすることから⁵⁾⁶⁾レーベル病におけるmtDNAの異常が推測された。最近、分子生物学の進歩によって遺伝子そのものの解析が可能となった。mtDNAもその全構造が決定され⁷⁾ミトコンドリアミオパチー、Kearns-Sayre 症候群などもそのmtDNAの異常が報告された^{8)~10)}。

1988年、Wallaceらにより、レーベル病に特異性が高いと考えられるmtDNAの11778番塩基対の点突然変異が発見された¹¹⁾¹²⁾。そしてここ数年の間に私たちが含めて日本でもいくつかのグループがこの点突然変異を確認し^{13)~17)}、ヨーロッパでもいくつかのグループが検討し約半数のレーベル病患者にこの点突然変異が認められることがわかっているが、遺伝的異質性も指摘されている^{18)~20)}。

私たちはPCR法によるレーベル病の診断の有用性についてすでに報告してきたが^{14)~16)}、本稿は今までの結果をまとめ、DNA診断が臨床の場と与える意義、問題点をあげ、過去の文献を検討し本疾患の原因について考察する。

II DNA 診断の実際

1. 症例

今回検討した家系1から4までを図1に示す。このうち、症例1(家系1, III-2)についてはすでに報告してあるが¹⁴⁾¹⁵⁾、さらに両親についての解析も加えた。症例2(家系2, III-1)は、27歳男性で、母方のいとこ(III-5)が12歳ごろ急激な両眼の視力低下をきたし、視神経症と診断されており、臨床所見についてはすでに根本らが報告している²¹⁾。症例3(家系3, III-4)は、兄(III-3)、母の兄2名(II-4, II-5)が、視神経萎縮のため視力不良である。症例4(家系4, III-2)は家系内発生がなく、球後視神経炎の診断のもとにステロイド全身投与を行ったが、視力改善のないまま転院し、経過観察されている17歳の症例である。さらに、球後視神経炎2例、多発性硬化症2例、乳頭小窩症候群2例と正常対照者4例について解析を行った。

2. 方法 (詳細は文献15を参照されたい。)

1) mtDNA の抽出 (Hirt 法)²²⁾ (Hirt 法を用いなく

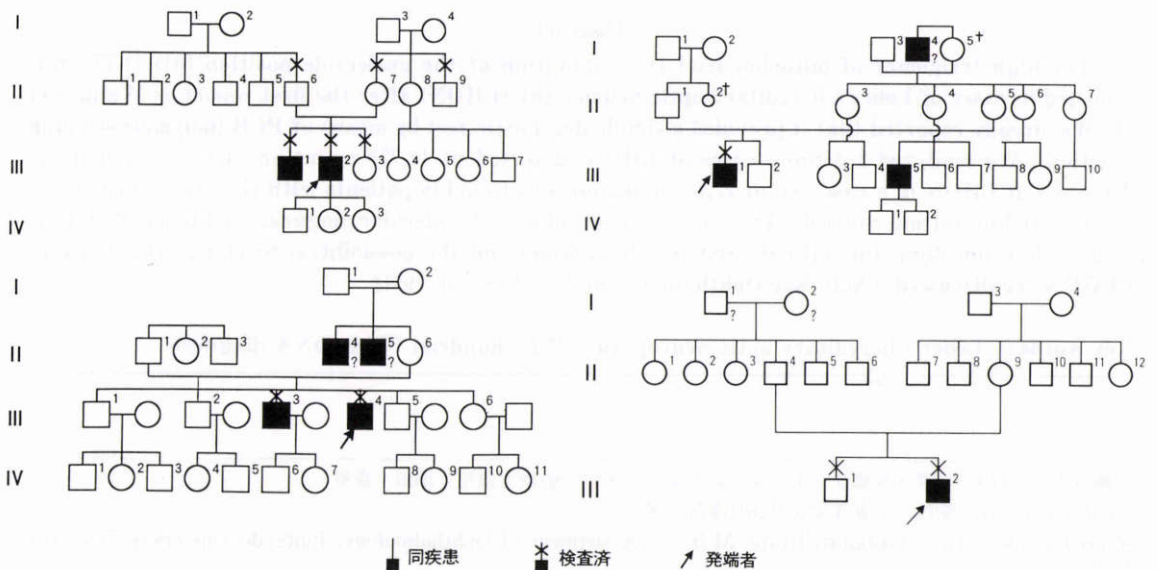


図1 左上, 症例1の家系図, 右上, 症例2の家系図, 左下, 症例3の家系図, 右下, 症例4の家系図

表 1 家系調査が行われた症例

臨床診断名	家系	症例	性別	11778番の点突然変異		最終診断
				<i>Sfa</i> NI	<i>Mae</i> III	
レーベル病	1	II-6	男性	-	-	正 常
		II-7	女性	+	+	保 因 者
		III-1	男性	+	+	レーベル病
		III-2(症例 1)	男性	+	+	レーベル病
		III-3	女性	+	+	保 因 者
レーベル病	2	III-1(症例 2)	男性	+	+	レーベル病
	3	III-4(症例 3)	男性	+	+	レーベル病
球後視神経炎*	4	III-2(症例 4)	男性	+	+	レーベル病

*: 家族歴からはレーベル病と診断できなかったが今回の結果でレーベル病と診断した症例

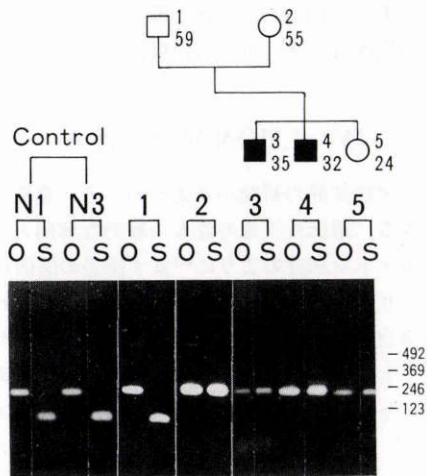


図 2 (文献16の図を引用)。症例 1 の患者，兄，妹，両親と正常者について，O は PCR で増幅して得られた DNA 断片，S は O を *Sfa* NI で切断したものをそれぞれ 2% アガロースゲルに流した。患者および兄と正常な妹，母では切断されず，正常者と患者の父は切断された。

ても DNA 抽出機で得た DNA を用いて同様にを行うことができる。)へパリン採血した 10~20ml の末梢血から白血球のみを分離し，mtDNA を精製する。

2) PCR 法による DNA の増幅²³⁾²⁴⁾

約 100ng の DNA と 2 種類のプライマーと Taq ポリメラーゼを用いて 94℃ 1 分，55℃ 30 秒，72℃ 1 分 30 秒のサイクルを 30 サイクル行って増幅する。増幅には Perkin Elmer Cetus の DNA 増幅システムを用いた。

3) 制限酵素による 11778 番塩基対の検討

増幅した DNA を精製し，*Sfa* NI と *Mae* III を用いて酵素反応を行い，2% アガロースゲルに流して

表 2 その他の視神経疾患 (全て孤発例)

臨床診断名	症例	性別	11778番の点突然変異	
			<i>Sfa</i> NI	<i>Mae</i> III
球後視神経炎	1	男性	-	-
	2	男性	-	-
多発性硬化症	1	男性	-	-
	2	男性	-	-
乳頭小窩症候群	1	女性	-	-
	2	男性	-	-
正常コントロール		男性	-	-
		男性	-	-
		女性	-	-
		女性	-	-

DNA 断片の大きさを確認する。本研究では 11660 塩基対から 11919 塩基対までを増幅したので正常では *Sfa* NI の認識部位である塩基配列 GCATC を認識して，DNA は 128 と 132 塩基対の二つに切断されるが，11778 番塩基対がグアニンからアデニンに変わっていると *Sfa* NI によって切断されないため DNA の大きさは増幅した 260 塩基対のまま変化がないことになる。一方 *Mae* III の有用性はすでに報告されているが²⁵⁾，突然変異が生じたことにより GTNAC という認識部位が生じ，逆に正常者は切断されず，突然変異を生じた Leber 病で切断されることになる。

3. 結果

図 2 (*Mae* III によるゲルの写真は省略した) と表 1 に示すように，レーベル病の家系 1 では，患者 2 人とその妹，および母にこの点突然変異がみられたが，父親は正常のパターンであった。症例 2，3 についても同様の点突然変異がみられた。また，家系内発生がな

く、球後視神経炎の診断のもとにステロイド全身投与を行ったが視力改善のなかった症例4にもこの点突然変異がみつかった。上記以外の球後視神経炎、多発性硬化症、乳頭小窩症候群と正常者では、この点突然変異はみられなかった。

III レーベル病の DNA 診断の得失

本症の詳細な家系分析により、男性患者の子孫に患者はなく (Lossen 法則)、carrier の女性の娘は97% (100%) carrier になる (北島法則)²⁶⁾ことが示され、このことから細胞質遺伝が疑われた。遺伝子の本態とされる DNA は主として核に存在するが、細胞質のミトコンドリアにも16569塩基対からなる mtDNA が存在し、全 DNA の1~2%を占めている。mtDNA は13種の mRNA、2種の rRNA、22種の tRNA をコードしているが mtDNA 自らが指令しているのは rRNA と tRNA だけで他の残りの因子は核 DNA に依存している。13種の mRNA から翻訳される蛋白質すべては単独では機能できず、酵素複合体 (複合体 I, III, IV と ATP 合成酵素) として機能する。

mtDNA の全塩基配列はすでに決定され、polymorphism が多いことが知られており、完全に細胞質遺伝をする。Wallace らは、1988年、NADH 脱水素酵素のサブユニット4 遺伝子の点突然変異(コドン340, 11778 番塩基対の変異によるアルギニンからヒスチジンへの転換)と、レーベル病が強い相関をしていることを示した¹¹⁾。その後、日本、ヨーロッパでもこの11778番の点突然変異 (Wallace の点突然変異) が追試され、正常ではこの点突然変異はみられず、レーベル病の約半数あまりにみられることが明らかになった。

井街は、聞き書きに頼った家系調査は正確さに欠けること、レーベル病は単発した場合診断できないことを指摘している⁴⁾。今回症例4のように単発した場合や詳細な家族歴が得られない場合、この点突然変異の検討が診断に有用であると考え、PCR 法による Wallace の点突然変異の検査は、血液10ml 以下で行えることや、制限酵素の利用で比較的簡単にわかるという利点がある。問題点としては、この点突然変異と発症の関係が不明なこと、レーベル病の家系すべてにみられるわけではないこと、点突然変異があっても必ずしも発症しないことが挙げられる。このように解決しなければならない課題はあるが、蛍光眼底造影で急性期の microangiopathy を証明することと異なり、どの時点でも行えるという特徴を持つ。それは、急性期を

すぎた症例のみならず、症状がない保因者の診断にも応用されうる。例えば、幼少期に検査し、この点突然変異が認められれば、一般の集団よりレーベル病の発症の可能性がかなり高いと言える。またこの点突然変異をもつ男性は、この mtDNA の異常を次世代へ伝えないが、女性にこの点突然変異がみつかった場合は、子へほぼ100%遺伝されることになる。従ってこのような新しい情報を医師が得られるようになったということは、レーベル病の有効な治療法がない現在、この情報を患者に伝えるか否かという問題になる。これは、病気の種類、予後、個々の患者のバックグラウンドなどにも影響される。私たちは、本邦において現時点では、保因者に対する相談は個々に応じた対応が必要であると考えているが、今後心理学的アプローチや、社会学的側面など多方面からの検討をしなければならぬだろう。

IV LHON 研究の行方

この点突然変異の研究が今後どのように発展するか考えてみる。遺伝性疾患の最も一般的な解明方法は、フェニルケトン尿症のように²⁷⁾まず疾患の原因が代謝異常であり、その原因となる酵素異常が発見され、その酵素蛋白に対応する遺伝子、mRNA の異常を検討してゆくという方法である。これに対してまず遺伝子の異常からそれに対応する蛋白質の異常を検討するという方法 (reversed genetics) がある。この例が Duchenne 型筋ジストロフィーであり²⁸⁾、X 染色体短腕の欠失をもった症例を参考にしてしらみつぶしに検討した結果、まず原因遺伝子が明らかにされた。そしてこの遺伝子に対応する蛋白質が筋肉がすべる時に重要である事がわかった。

レーベル病の場合、この点突然変異が原因と考えると、NADH 脱水素酵素のサブユニット4 が関わる電子伝達系の複合体Iが注目される。Uemura ら²⁹⁾はレーベル病患者の骨格筋における NADH 脱水素酵素活性の低下はみられなかったとしている。一方、複合体Iの欠乏例に視神経萎縮を認めたという報告がある³⁰⁾。また Parker Jr ら³¹⁾はレーベル病の NADH-coenzyme Q reductase 活性 (複合体Iの特異的定量)を測定し、その低下を指摘し、複合体Iを構成する7個のサブユニット (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6)の異常によるものではないかと考察している。しかし、複合体Iの異常は完全欠損ではなく、また、複合体Iの低下がなぜ本症状をひきおこすのかは不明である。レー

ベル病にはその原因としてシアン中毒を指摘する意見もあり³¹⁾³²⁾, またこれは核DNAにコードされる rhodanese の酵素活性の低下であるという報告がある³³⁾. (それを否定する報告もある³⁴⁾.) これらの報告や, レーベル病家系内に同じ mtDNA を持ちながら発症しない場合があること, 発症は男性に多いことなどを考慮すると mtDNA の点突然変異のみでは説明が難しく, この疾患の研究を複雑にさせている. そして今まで否定的であった heteroplasmy (正常な DNA と変異をもつ DNA 分子が共存する状態) がレーベル病において存在するという報告があり³⁵⁾, この意味については今後検討される必要があるだろう. またこの点突然変異をはじめとする遺伝子の異常に, 何らかの誘因がひき金となって発症することも考えられる. 一方, 小沢ら³⁶⁾によるとミトコンドリア遺伝病の研究の急速な進歩により従来の疾患分類の変革が迫られているという. レーベル病も例外でないのかもしれない. また, mtDNA はミトコンドリア外で免疫, 分化, 癌化などの多用な生命現象に関わりあうことが知られてきている³⁷⁾³⁸⁾. 従って単純にこの点突然変異の産物による複合体 I の低下とは異なる現象が発症に関与している可能性もある.

文 献

- 1) **Leber T**: Ueber hereditäre und congenitale angelegte Sehnervenleiden. *Albrecht v Graefes Arch Ophthal* 17: 249—291, 1871.
- 2) **Egger J, Wilson J**: Mitochondrial inheritance in a mitochondrially mediated disease. *New Eng J Med* 309: 142—146, 1983.
- 3) **Nikoskelainen EK, Savontaus M-L, Wanne OP, et al**: Leber's hereditary optic neuropathy, a maternally inherited disease. *Arch Ophthalmol* 105: 665—671, 1987.
- 4) 井街 謙: レーベル氏病. *日眼会誌* 77: 1658—1735, 1973.
- 5) **Fine PE**: Mitochondrial inheritance and disease. *Lancet* II: 659—661, 1978.
- 6) **Giles RE, Blanc H, Canin HM, et al**: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6715—6719, 1980.
- 7) **Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al**: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457—465, 1981.
- 8) **Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA**: Deletion of mitochondrial DNA in patient with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717—719, 1988.
- 9) **Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, et al**: Deletion of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 38: 1339—1346, 1988.
- 10) **Moreas CT, DiMauro S, Zeviani M, et al**: Mitochondrial DNA deletion in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *New Eng J Med* 320: 1293—1299, 1989.
- 11) **Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al**: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427—1430, 1988.
- 12) **Singh G, Lott MT, Wallace DC**: A mitochondrial DNA mutation as a cause of Leber's hereditary optic neuropathy. *New Eng J Med* 320: 1300—1305, 1989.
- 13) **Yoneda M, Tsuji S, Yamauchi T, et al**: Mitochondrial DNA mutation in family with Leber's hereditary optic neuropathy. *Lancet* I: 1076—1077, 1989.
- 14) **Hotta Y, Hayakawa M, Saito K, et al**: Trial of early diagnosis of Leber's optic neuropathy by means of polymerase chain reaction. *Am J Ophthalmol* 108: 601—602, 1989.
- 15) 堀田喜裕, 藤木慶子, 早川むつ子, 他: Polymerase chain reaction (PCR) 法による Leber 病の早期診断の試み. *臨眼* 44: 1237—1240, 1990.
- 16) **Fujiki K, Hotta Y, Hayakawa M, et al**: A mutation of mitochondrial DNA in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. *Jpn J Hum Genet*, in press.
- 17) 真島行彦, 小口芳久, 植村恭夫, 他: レーベル病 (Leber's hereditary optic neuropathy) の DNA 診断. *日眼会誌* 94: 683—687, 1990.
- 18) **Vilkkil J, Savontaus M-L, Nikoskelainen EK**: Genetic heterogeneity in Leber hereditary optic neuropathy revealed by mitochondrial DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 45: 206—211, 1989.
- 19) **Holt JJ, Miller DH, Harding AE**: Genetic heterogeneity and heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *J Med Genet* 26: 739—743, 1989.
- 20) **Howell N, McCullough D**: An example of Leber hereditary optic neuropathy not involving a mutation in the mitochondrial ND4 gene. *Am J Hum Genet* 47: 629—634, 1990.
- 21) 根本 正, 矢島保道, 沖坂重邦, 他: 高気圧酸素療法を試み一時的な視力消失を来したレーベル病の1例. *眼科* 31: 201—204, 1989.
- 22) **Hirt B**: Selective extraction of polyoma

- DNA from infected mouse cell culture. *J Mol Biol* 26: 365—369, 1967.
- 23) **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al:** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350—1354, 1985.
 - 24) 榑 佳之: DNA ポリメラーゼ増幅(PCR法)による高感度DNA診断法. *実験医学* 7: 116—120, 1989.
 - 25) **Stone EM, Coppinger JM, Karden RH, et al:** *Mae* III positively detects the mitochondrial mutation associated with type I Leber's hereditary optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 108: 1417—1420, 1990.
 - 26) 北島 勲: レーベル氏病=就イテ, 附. 本病ノ一新家系. *日眼* 34: 23—47, 1930.
 - 27) **Ledley FD, Grenett HE, Dilella AG, et al:** Gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase. *Science* 228: 77—79, 1985.
 - 28) **England SB, Nicholson LV, Johnson MA, et al:** Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343: 180—182, 1990.
 - 29) **Uemura A, Osame M, Nakagawa M, et al:** Leber's hereditary optic neuropathy: Mitochondrial and biochemical studies on muscle biopsies. *Brit J Ophthalmol* 71: 531—536, 1987.
 - 30) **Morgan-Hughes JA, Hayaes DJ, Clark JB, et al:** Mitochondrial encephalomyopathies. biochemical studies in two cases revealing defects in the respiratory chain. *Brain* 105: 553—582, 1982.
 - 31) **Parker WD Jr, Oley CA, Parks JK:** A defect in mitochondrial electrontransport activity (NADH-coenzyme Q oxidoreductase) in Leber's hereditary optic neuropathy. *New Eng J Med* 320: 1331—1332, 1989.
 - 32) **Wilson J:** Leber's hereditary optic atrophy; a possible defect of cyanide metabolism. *Clin Sci* 29: 505—515, 1965.
 - 33) **Cagianut B, Schnebli HP, Rhyner K, et al:** Thiosulfat-sulfur-transferase-Mangel bei Lebers hereditärer Optikusatrophie. *Klin Mbl Augenheilk* 181: 32—35, 1982.
 - 34) **Nikoskelainen E, Hassinen IE, Paljarvi L, et al:** Leber's hereditary optic neuroretinopathy, a mitochondrial disease? *Lancet* II: 1474, 1984.
 - 35) **Vilkkil J, Savontaus M-L, Nikoskelainen EK:** Segregation of mitochondrial genomes in heteroplasmic linkage with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 47: 95—100, 1990.
 - 36) 小沢高将, 杉山 理, 田中雅嗣: ミトコンドリア遺伝子病における遺伝子変異. *蛋核酵* 35: 3104—3112, 1990.
 - 37) 林 純一: 融合細胞を用いたミトコンドリアDNAの体細胞遺伝学的研究—ミトコンドリアゲノムの形質発現およびゲノムとの相互作用を中心として—. *蛋核酵* 29: 344—356, 1984.
 - 38) 林 純一: 高等動物のミトコンドリアDNAとその生理学的役割. *蛋核酵* 35: 212—224, 1990.