第97回 日本眼科学会総会 宿題報告 眼と分子生物学

網膜色素変性症の分子生物学的研究

中 沢 満 東北大学医学部眼科学教室

共同研究者

鬼川 栄美,野呂 洋子,千田 靖,神尾 一憲,佐久間健彦 野呂 充,石黒 誠一,塩野 貴,奥山 茂美,玉井 信 研究協力者

堀田 善裕, 早川むつ子, 橋本 敏浩, 藤木 慶子, 金井 淳中島 章, 鈴木 純一, 小柳 秀彦, 中川 喬, 玉木 光子所 敬, 三宅 養三, 粟屋 忍, 西占三千子, 坂井 譲山本 節, 北畑 龍生, 田淵 昭雄, 直井 信久, 澤田 惇伊佐敷 靖, 大庭 紀雄, Andreas Gal, Shomi S. Bhattacharya Peter Humphries

要 約

網膜色素変性症の原因を遺伝子のレベルで解明し,さらに,網膜変性機構の解明への糸口をさぐることを目 的として、分子生物学的手法を用いて研究を行った、本疾患の遺伝子レベルでの原因解明のひとつの手法とし て候補遺伝子検索(candidate gene approach)を行い,ロドプシン,ペリフェリン/RDS,フォスデューシ ンの各遺伝子に着目した遺伝子診断スクリーニングを非ラジオアイソトープによる SSCP (single strand conformation polymorphism) 法を用いて行った. 対象は,常染色体優性網膜色素変性症 (ADRP) 56 家系 を含む 387 名の網膜色素変性症患者とし,白血球からゲノム DNA を精製して適宜スクリーニングに用いた. その結果, ロドプシン遺伝子 (Pro-347-Leu) とペリフェリン/RDS 遺伝子 (Asn-244-Lys) に変異をもつ ADRP 家系を 1 家系ずつ検出した。引き続き網膜変性機構解明の手懸かりを得ることを目的として、それぞれ の家系の遺伝子異常と表現型である臨床像との関連を検索した。ロドプシン遺伝子コドン 347 の変異 (Pro-347-Leu)では欧米の同一変異をもつ家系の臨床像に類似しており,人種差を超えた共通性が見出された。ペ リフェリン/RDS 遺伝子コドン 244 の変異(Asn-244-Lys)では定型的網膜色素変性症の所見に加え、bull'seye maculopathy を来すことが観察され,ペリフェリン/RDS 遺伝子異常が病像に及ぼす影響の一端が明ら かとなった、最後に、マウスにおけるペリフェリン/RDS遺伝子の異常によって発症する網膜変性モデル動物 である rds/rds マウスを用い, 視細胞変性機構をさぐるひとつの試みとして発達期マウス視細胞内グルタミン 酸を免疫組織学的に定量したところ,rds/rds マウス視細胞内節にグルタミン酸の蓄積がみられ,ペリフェリ ン/RDS 遺伝子異常による視細胞変性過程でグルタミン酸が関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 97: 1394—1405, 1993)

キーワード:網膜色素変性症,候補遺伝子検索,ロドプシン,ペリフェリン/RDS,rds マウス

別刷請求先: 980 仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学医学部眼科学教室 中沢 満 (平成5年8月26日受付,平成5年10月1日改訂受理)

Reprint requests to: Mitsuru Nakazawa, M.D. Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine. 1-1 Seiryo-machi, Aoba-ku, Sendai 980, Japan

(Received August 26, 1993 and accepted in revised form October, 1993)

A Molecular Biological Study on Retinitis Pigmentosa

Mitsuru Nakazawa

Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

Abstract

Retinitis pigmentosa was investigated with molecular genetic techniques, to identify gene abnormalities and to obtain a better understanding of the mechanism of retinal degeneration. First, a search for candidate genes was perfermed focusing on rhodopsin, peripherin/RDS, and phosducin genes, using non-radioisotopic SSCP and genomic DNA samples obtained from 387 Japanese patients with retinitis pigmentosa, including 56 families of the autosomal dominant type (ADRP). One ADRP family with rhodopsin Pro-347-Leu mutation and another with peripherin/RDS Asn-244-Lys mutation were identified. The genotype and phenotype correlation of each ADRP family was then analysed. Ocular findings associated with the rhodopsin Pro-347-Leu in the Japanese family were similar to those reported in Caucasian families, indicating that the same mutation can produce the common phenotype even among different ethnic populations. The phenotype associated with the peripherin/ RDS Asn-244-Lys showed typical findings of retinitis pigmentosa associated with bull's-eye maculopathy. Finally, glutamate was immunohistochemically quantified in the photoreceptor inner segment of rds/rds mice using anti-Glu antibody. The results showed that glutamate was accumulated in the rds/rds mouse photoreceptor inner segment, suggesting that glutamate may play a role in the process of retinal degeneration caused by the peripherin/RDS gene abnormality, although the precise mechanism is currently unknown. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1394-1405, 1993)

Key words: Retinitis pigmentosa, Candidate gene approach, Rhodopsin, Peripherin/RDS, Rds mouse

I 緒 言

1. はじめに

網膜色素変性症は進行性の夜盲と視野狭窄を主症状 とし、徐々に失明へと至る遺伝性網膜変性疾患で、我 が国における有病率は人口10万人に対して 12.5~36.8人と推定されている1)~3)。また、本疾患は我 が国における成人中途失明原因の上位にあり、1987年 の厚生省の統計によると糖尿病網膜症, 緑内障に次い で白内障と並び第3位に位置している。近年の眼科学 の進歩に伴って、糖尿病網膜症や緑内障, 白内障に対 してより有効な治療法が開発され,多くの患者が失明 を免れえるようになってきた. これに対して、網膜色 素変性症に対しては現在でもその進行を阻止できるほ どの有効な治療法はないといってよい. このような疾 患に対してどのような治療法を開発してゆくのかとい うことが、今後21世紀にかけて大きな課題となること と思われる. その一環として近年急速に眼科学に応用 されてきたのが分子生物学的研究方法であり、この方 法により従来全く原因のわからなかった網膜色素変性 症も一部ではあるが、遺伝子のレベルでその原因が明 らかにされつつある。

眼科学における分子生物学も臨床医学の研究である以上,最終的目標はよりよい治療法の開発へ向けられるべきものと考えられる。分子生物学を用いた臨床医学の研究の流れとしてひとつ考えられるのは,まず第1段階として病気の原因を遺伝子や蛋白質のレベルで明らかにし,引き続いて第2段階として細胞内の代謝や細胞内小器官の構造変化といった細胞レベルで網膜変性機構を明らかにし,それらの知識の上に第3段階として特異的かつ有効な治療法が考案,開発されてくることである。将来,よりよい治療法が生みだされることを期待しつつ現段階で我々が成し得ることは網膜色素変性症の原因を遺伝子レベルで解明し、さらに、それらの知識をもとに網膜変性機構を解明してゆくことにあると思われる。

2. 網膜色素変性症の原因遺伝子に関する世界の研究状況

遺伝性疾患の原因遺伝子検索法として、現在広く用いられている方法にポジショナルクローニング

(positional cloning)4)と候補遺伝子検索 (candidate gene approach)5)の2つがある. その具体的方法論に 関しては他の文献にゆずるとして、網膜色素変性症に 対してはポジショナルクローニングのうちでも連鎖解 析によって大まかに原因遺伝子の部位が推定され、引 き続き候補遺伝子検索により原因遺伝子が同定される という方法が多くとられてきている. これまでに判明 している原因遺伝子としては常染色体優性網膜色素変 性症 (autosomal dominant retinitis pigmentosa, ADRP) におけるロドプシン遺伝子 (第3染色体)6). ペリフェリン/RDS遺伝子(第6染色体)718), ロム1遺 伝子(第11染色体)9の異常が同定された他、遺伝子は 未だ同定されていないが,第8染色体長腕10,第7染色 体短腕11)および同長腕12)にそれぞれ1か所ずつ原因と 考えられる遺伝子座が推定されている。 常染色体劣性 網膜色素変性症 (autosomal recessive retinitis pigmentosa, ARRP) においても、ロドプシン遺伝子13)お よび cGMP phosphodiesterase β-subunit 遺伝子 (第 4 染色体)14)の異常が報告されている。これらの報告を 総合すると、網膜色素変性症の原因となる遺伝子異常 の多くは、これまでに判明した範囲では網膜に特異的 に発現する遺伝子の突然変異であり、変異部位は家系 ごとの分布はかなりランダムなものであることと. 遺 伝子異常の種類と頻度は人種や地域により差があるら しいことなどが類推されてきている.

3. 本研究の目的

このような世界の状況をふまえて本研究で目的とした点は、まず第1に日本人における網膜色素変性症、とくに ADRP についてその原因遺伝子の種類や頻度を明らかにし、これまでの欧米での報告と比較することにより人種の差による遺伝子異常の差の有無、さらに、日本人に特徴的な遺伝子異常の有無を検索するという点と、第2に遺伝子の異常がどのような機序で網膜変性を引き起こすのかを知るための基礎となる知見を得るという点である。

この2つの目的のため、本研究では以下の4項目について研究を行った。まず、第1に遺伝子異常を検索するためにできるだけ多数の本症患者のゲノムDNAを収集し、得られたゲノムDNAを用いて、第2にPCR-SSCP法を用いて遺伝子診断スクリーニングを行った。第3に遺伝子異常が判明した家系について、遺伝子異常とその表現型である臨床所見との関連につき各年齢層ごとに検索した。第4に網膜変性モデル動物であるrdsマウスを用いて、rdsマウス網膜視細胞

中のグルタミン酸を定量した。以上の研究項目について、順にその結果を報告する。

II 患者ゲノム DNA の収集

前述の遺伝性疾患に対する分子生物学的研究方法の うち、網膜色素変性症のような多因子疾患では、どち らかというと候補遺伝子検索が現段階では原因遺伝子 同定という目的には適しているものと思われる。そこ で、本研究では日本人の網膜色素変性症患者に対する 候補遺伝子検索を行うこととした. 方法については後 述するが、その目的のためには多数の患者のゲノム DNA をスクリーニングする必要があり、我々の施設 だけでは患者数に限界があった。 そこで、全国の各施 設に協力を依頼し、本症患者の血液ないし精製したゲ ノム DNA の送付を依頼した. その結果, 本症患者 387 名の血液ないしゲノム DNA が集められた。387名の 内訳は ADRP 56 家系 106 名, ARRP 82 家系 96 名, Usher 症候群 11 家系 12 名. Leber 先天盲 4 家系 5 名. X 染色体劣性網膜色素変性症5家系10名, 孤発例148 名、その他 10 名であった。387 名および ADRP 56 家 系の地理的分布を図1,2に示す。

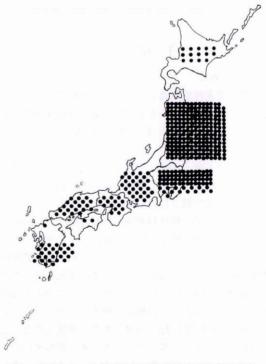


図1 対象となった網膜色素変性症患者 387 名の分布 を示す。



図 2 網膜色素変性症患者のうち, autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) 56 家系の分布を示す.

血液サンプルからは既報の方法 15 に従って白血球を分離し、SDS 処理、proteinase K 消化、フェノール抽出、エタノール沈殿の順で高分子ゲノム DNA を精製した。精製された遺伝子 DNA は TE 緩衝液(pH 8.0)にて透析後定量し、次の段階へと進んだ。

III 遺伝子診断スクリーニング (候補遺伝子検索)

前述のごとく、これまでの網膜色素変性症に対する分子生物学的研究の成果によって、本症の原因となる遺伝子が網膜に特異的に発現する蛋白質をコードするものであることが次第に明らかになってきている。そこで、逆に網膜に特異的に発現する遺伝子に注目し、これを候補遺伝子として、その遺伝子に異常をもつ例をスクリーニングによって検出してゆく方法を用いて、本症の遺伝子異常を同定することとした(候補遺伝子検索)、本研究で候補遺伝子としたのは、すでにその異常によって網膜色素変性症が発症し得ることが明らかとなっているロドブシン遺伝子⁶⁾¹⁶⁾、ベリフェリン/RDS遺伝子⁷⁾⁸⁾に加えてフォスデューシン(MEKA蛋白質)をコードする遺伝子¹⁷⁾の三者である。

遺伝子診断スクリーニング法としては、これまで 種々の方法15)16)18)~23)が考案されている。これまでの研 究によって, 本症の突然変異部位はレーバー病におけ るミトコンドリア DNA の 11877 番の変異24)25)とは異 なり、ある特定の場所に存在するのではなく、家系ご とにかなりランダムな分布を示すことが知られてい る²⁶⁾. したがって, 本研究においてもランダムな分布を 示す変異部位を検出できる方法を用いる必要があっ た.この目的にかなう方法としては、これまでに SSCP 法(single strand conformation polymorphism)19)~21). DGGE 法 (denaturing gradient gel electrophoresis)²²⁾, heteroduplex 法²³⁾などが考案されている。本 研究では簡便性と安全性からラジオアイソトープを用 いずに、銀染色法によりDNAを可視化する nonradioisotopic SSCP 法²⁰⁾²¹⁾を採用した。II で得ら れた患者のゲノム DNA を鋳型としてロドプシン遺伝 子、ペリフェリン/RDS遺伝子およびフォスデューシ ン遺伝子の各エクソンを PCR 法27)により増幅し、引 き続き8~10% アクリルアミドゲルまたは1X MDE hvdrolink ゲルを用いた非変性ゲルにて電気泳動を 行った. 電気泳動はアクリルアミドは 0.4 mm 厚の塩 基配列決定用ゲル装置にて、また、MDE hydrolink ゲ ルは 1.0 mm 厚のスラブゲル装置 (10×7 cm) を用い た。DNA は前述のごとく銀染色 (Bio-Rad 社, silver stain kit) にて DNA を観察した。 異常が認められた DNA については、プラスミドベクターpBluescript ま たは pGEM にサブクローニングした上でひとつの PCR 産物につき 6 個以上のクローンについて塩基配 列を決定した。塩基配列は螢光プライマーを用いた dideoxy 法により A.L.F. オートシークエンサー (Pharmacia 社) により決定した.

1. ロドプシン遺伝子の検索

対象は、ADRP 43 家系、ARRP 60 家系を含む網膜色素変性症患者 250 名であり、ロドブシン遺伝子の 5 個のエクソンとプロモーター領域約 280 bp を含む 7 つの領域に分け(図 3)PCR-SSCP 法を行った。今回の検索により疾患の原因となり得る異常パターンを示したのは既報 $^{15/28/29/9}$ のエクソン 5 に位置するコドン 347 CCG (Pro) が CTG (Leu) に変異する異常をもつ 1 家系のみであった。その家系における SSCP 像を図 4 に示す。また、これとは別に疾患の原因とはならない DNA の変異であるポリモルフィズムについては、今回の検索で翻訳開始コドンの 26 塩基上流の A → G (図 5)、第 4 イントロン内の第 5 エクソン開始部から

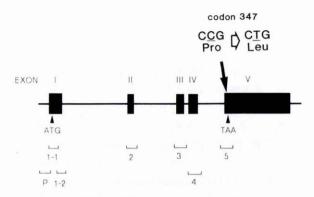


図3 ロドプシン遺伝子と polymerose chain reaction (PCR) 法による増幅部位. 各 PCR 産物の長さは 250 bp 前後とした.

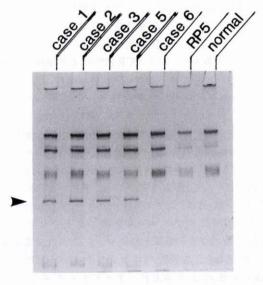


図 4 ロドプシン遺伝子コドン 347 の変異(CCG → CTG)をもつ家系における SSCP 所見.

症例 1 , 2 , 3 , 5 は ADRP の同一家系における網膜色素変性症患者であり、症例 6 は同一家系の健常者,N は正常人 DNA を示す。矢尻で示された位置が突然変異をもつ DNA に由来するバンド。ミニスラブゲルによる SSCP.

24 塩基上流の G → A (図 6) の 2 カ所が確認された。2. ペリフェリン/RDS 遺伝子の検索

ベリフェリン/RDS 遺伝子については、ADRP 56 家系を対象とした。ベリフェリン/RDS 遺伝子の 3 つのエクソンのうち、第 1 エクソンと第 2 エクソンに焦点をしぼり、第 1 エクソンは 4 つの部位に、第 2 エクソンは 2 つの部位に分割して PCR 法にて増幅した(図

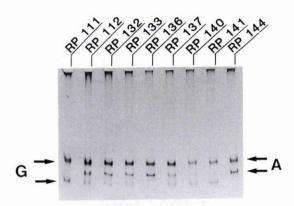


図 5 ロドプシン遺伝子エクソン 1 にみられたポリモルフィズムの SSCP 所見.

翻訳開始コドンの 26 bp 上流が A である DNA と G である DNA の下方バンドの易動度の差を示す. 両方のバンドをもつ症例は両者のヘテロ接合体であることを示す. ミニスラブゲルによる SSCP.

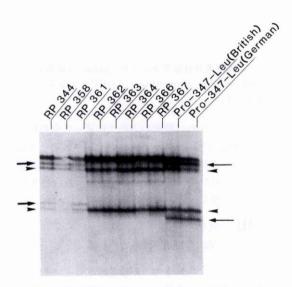


図6 ロドプシン遺伝子イントロン4にみられたポリモルフィズムのsingle strand confernation polymorphism (SSCP) 所見.

左から 3 症例に共通してみられる矢印に示された異常バンドがエクソン 5 開始点より 24 bp 上流が A である DNA. 他の症例と共通してみられるバンドは同部位が G である DNA. 最上のバンドは非特異的増幅産物. 右端の 2 症例はコドン 347 の変異 $(CCG \rightarrow CTG)$ をもつイギリスとドイツの症例. シークェンス用ゲルによる SSCP.

7). 引き続き SSCP 法にて変異の有無につきスクリーニングを行った. その結果, 網膜色素変性症の原

因となり得る変異を1家系についてエクソン2に認めた。その SSCP 像を図8に示す。図8に示されたレーン5の症例が発端者であり、この症例と同一家系の患者8名に同様な異常バンドの出現が確認された。また、同一家系の健常者にはこのような異常バンドは出現しなかった。塩基配列を調べてみると、この異常バンドはコドン244の AAC (Asn)が AAA (Lys) に変異することに由来することが判明した。この家系については SSCP 上、他の PCR 産物に異常は認められていない。

3. フォスデューシン遺伝子の検索

フォスデューシン遺伝子については 4つのエクソンのうち、アミノ酸をコードしている第 2、第 3、第 4 エクソンについて、これを 4 か所に分け(図 9)、PCR-SSCP 法に τ スクリーニングを行った。対象は、ADRP 36 家系、ARRP 50 家系を含む 230 例としたが、フォスデューシン遺伝子については異常が確認された例はなかった。

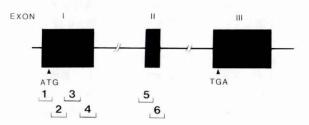


図 7 ペリフェリン/RDS 遺伝子と PCR 法による増幅部位。

各 PCR 産物の長さは 180 bp 前後とした.

IV 遺伝子異常と表現型との関連

遺伝子異常の検索の結果から、次に網膜変性機構の解明の手懸かりを得ることを目的として、まず第一段階として遺伝子異常が確認された例について、その表現型である臨床所見を各年齢層にわたり検索した。これは遺伝子異常がどのような臨床所見に関連するかを明らかにすることにより、ある特定の遺伝子異常が網膜変性に実際に及ぼす影響を知ることができるのではないかとの考えに基づく。

ロドプシン遺伝子コドン347の異常(Pro-347-Leu)の眼所見の特徴

本家系の臨床像の特徴については、すでに Shiono ら²⁹⁾により報告されている。本研究で対象としたのは ADRP の同一家系 4 名であり、症例 II-4 (発端者) 49

1 2 3 4 5 6 7 8 9

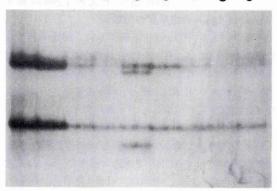


図 8 ペリフェリン/RDS 遺伝子エクソン 2 にみられた異常バンド (レーン 5).

コドン 244 の変異 (AAC → AAA) に由来する.

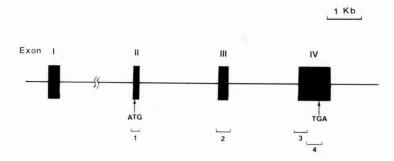


図 9 フォスデューシン遺伝子と PCR 法による増幅部位. 各 PCR 産物の長さは 100 から 300 bp の間になるようにした.

歳, 症例II-5(弟) 47歳, 症例III-1(長女) 20歳, 症例III-2(次女) 12歳という構成である. これらの症例の臨床所見をまとめると, 以下のようになる.

眼底所見はいずれの例もびまん性の網膜色素変性症のタイプを示し、周辺部から中間周辺部の萎縮性変化は年齢とともに重症となるが、中心窩はよく保存され49歳の症例II-4でも中心視力は1.0を保持している。視野は傍中心部の暗点から始まり、年齢とともに求心性狭窄となる。網膜電図 (ERG) 所見では12歳の症例で、white flash ERGにてa波、b波ともに振幅の低下を示し、30 Hz フリッカーERGにても振幅の低下を示すが、20歳以上の症例ではいずれの症例でも white flash ERG、フリッカーERG ともに消失型を示した。

ロドブシン遺伝子コドン347の異常についてはこれまでに報告30)があり、本家系と基本的には類似した臨床所見をたどることが示されている。このことは人種が異なっても遺伝子異常が同じであれば、同様の臨床像を来すことを示唆している。

ペリフェリン/RDS 遺伝子コドン 244 の異常 (Asn-244-Lys) の眼所見の特徴

ベリフェリン/RDS遺伝子異常を伴う網膜変性症の臨床像についてはこれまで報告があり^{31)~33)}, その突然変異部位を図 10 に示す. これまでの報告を総合すると, ベリフェリン/RDS遺伝子はその変異部位により様々な臨床所見を呈するという点が明らかになっている. 今回の検索で明らかとなったコドン 244 の変異はこれまでに世界で報告がなく,新しい知見である. 我々はこの異常をもつ ADRP 1 家系 8 症例について, その臨床所見を調査した. 対象は, II-5 (発端者, 63 歳), III-6(弟, 62 歳), III-9(妹, 53 歳), III-2(発端者次女, 37 歳), III-3 (同三女, 32 歳), III-4 (II-6 の長男, 34 歳), III-6 (II-9 の長女, 23 歳), IV-1 (II-2 の長男, 9歳) である. 本家系の臨床像の特徴をまとめると, 以下の通りとなる.

眼底像ではびまん性の網膜色素変性を示し、中間周辺部から周辺部にかけての領域に主として変性が生じる。 黄斑部は 30 代前半までは比較的正常な所見を呈し、中心視力はこの時期までは矯正にてほぼ 1.0 を保つ傾向にある。30 代後半以降の症例には、びまん性網膜変性に加えて黄斑部にも所見を認めるようになる。それは 30 代~50 代にかけては中心窩を囲む領域の網膜下に黄白色顆粒状沈着物として認められ、螢光眼底写真上いわゆる bull's-eye maculopathy の所見となり、60 代になると黄斑部の萎縮性病巣となる。視力も

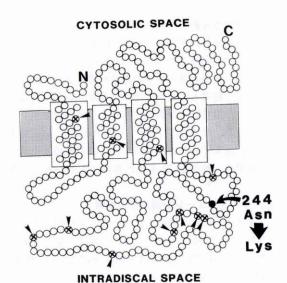


図 10 ペリフェリン/RDS の模式図と 244 番目のア ミノ酸 (正常では Asn) の位置.

これまでに変異が報告されている部位を矢尻で示す.

bull's-eye maculopathy の出現とともに低下し,III-2 では 0.5, II-9 では $0.1 \sim 0.3$ であり,黄斑部萎縮性病巣を来している II-5,II-6 では眼前手動 ~ 0.02 に低下している。視野ではロドプシン遺伝子コドン 347 の変異による網膜色素変性症同様,傍中心部の感度低下に始まり,不規則な輪状比較暗点へ進行し,最終的には求心性狭窄へ至る。ERG では夜盲の自覚のないIV-1 でも杆体系 ERG ですでに消失型を示し,錐体系 ERG では subnormal 型を示した。III-6 より年齢の高い症例では杆体系,錐体系いずれの ERG でも反応消失型となっていた。暗順応検査では年齢に従って最終閾値の上昇が認められ,III-6 では正常に比し $1.0\log$ unit,III-4 では $3.0\log$ unit,III-6 では $5.0\log$ unit 上昇を示した。

ペリフェリン/RDS 遺伝子コドン 244 の異常(Asn \rightarrow Lys)による網膜色素変性症は、びまん性の網膜変性に加えて 30 代後 半以降 にみられる bull's-eye maculopathy が特徴的である。これは、従来 ADRP の約 40% に認められるとされてきた bull's-eye maculopathy の原因のひとつにペリフェリン/RDSの異常が関与していることを示すものであり、今後のbull's-eye maculopathy の発症機構解明にひとつの手懸かりをもたらす結果となった。

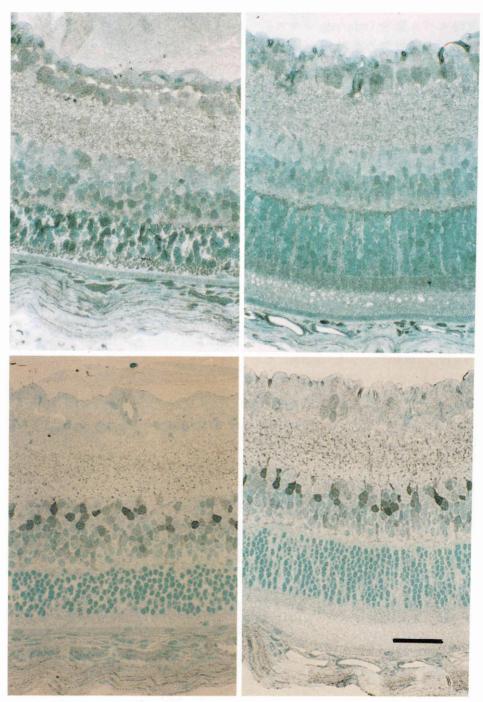


図 11 rds/rds マウス網膜におけるグルタミン酸とグリシンの免疫組織化学所見. 左上写真:rds/rds マウス網膜におけるグルタミン酸の分布。右上写真:Balb/c マウス網膜におけるグルタミン酸の分布。右上写真:Balb/c マウス網膜におけるグルタミン酸の分布。右下写真:Balb/c マウス網膜におけるグリシンの分布。右下写真:Balb/c マウス網膜におけるグリシンの分布。グリシンは両者とも内網状層と内顆粒層に認められる。rds/rds マウスおよび Balb/c マウスいずれも生後 3 週目のもの。 4 枚ともに同一の倍率であり,右上写真中のバーは 50 μ m。

V 網膜変性モデル動物 (rds/rds マウス) における視細胞異常の検索

日本人においてもベリフェリン/RDS 遺伝子異常による網膜色素変性症の存在が確認されたことにより、マウスにおける同一の遺伝子異常によって発症する retinal degeneration slow(rds/rds)マウスにおける網膜変性機構を解明することは、ヒトにおける網膜色素変性症の網膜変性機構を知る上で大きな示唆を与えるものとなろう。そこで、今回我々は興奮性神経伝達物質として知られ、また、網膜変性にも関与すると考えられるグルタミン酸³⁴⁾³⁵⁾について、発達期 rds/rdsマウス網膜内での分布を抗グルタミン酸抗体を用いた免疫組織化学的方法にて検索した。

対象は、rds/rds マウス生後 3 週と 9 週の眼球を用い、2.5% グルタールアルデヒドにて固定し、r セトンにて脱水後 LR white に固定した。一次抗体としてアフィニティカラムにて精製したウサギ抗グルタミン酸抗体を用い、二次抗体として金コロイド標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて銀染色を行い光学顕微鏡にて、また、酢酸ウラン・鉛二重染色を行い電子顕微鏡にて観察した。対照として同一週齢の Balb/c マウス眼を

用い, さらに, グルタミン酸以外のアミノ酸としてウ サギ抗グリシン抗体を用いてグリシンについても同様 に検討を加えた.

光学顕微鏡での結果を図11に示す。グルタミン酸は Balb/c マウスとの比較で rds/rds マウスにおいて視 細胞内節により蓄積している所見を得た。これをより 定量的に観察するため、電子顕微鏡的に視細胞内節内 に認められた金コロイド粒子をカウントして比較した ところ(図 12). 生後 3 週目では rds/rds マウス 365± 80, Balb/c マウス 220±120 GCP/µm², 生後 9 週目で は rds/rds マウス 415±70, Balb/c マウス 300±60 GCP/µm²(平均生標準偏差)で、いずれの週において も rds/rds マウスにおいて有意水準1%にて統計学 的に有意なグルタミン酸の上昇が認められた。また、 対照として用いた抗グリシン抗体によるグリシンの観 察では、rds/rds マウスと Balb/c マウスとの間に差は 認められず(図10)、また、視細胞内節における蓄積も 認められなかった。このことは rds/rds マウスにおけ る視細胞内節でのグルタミン酸の蓄積がペリフェリ ン/RDS 遺伝子異常によって起こる視細胞変性に伴っ て起こる特異性の高い現象であることを示している. 現時点では、グルタミン酸の蓄積が視細胞変性の原因

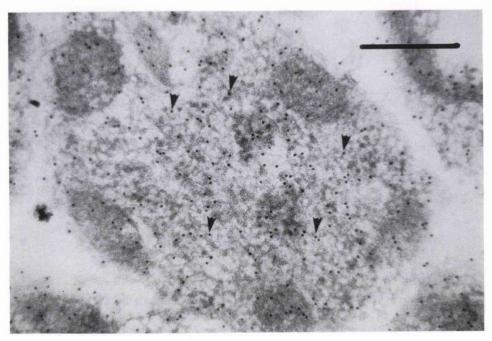


図 12 $\mathbf{rds/rds}$ マウス視細胞内節に認められた抗グルタミン酸抗体の反応を示す金コロイド. 生後 3 週目、バーは $1\,\mu\mathrm{m}$.

なのか結果なのかは不明であるが、視細胞変性機構を 知る上でひとつの方向性を示す結果であると思われ る.

VI 考按およびまとめ

今回の検索では、ロドブシン遺伝子異常による ADRP は 46 家系中 1 家系にのみ認められたにすぎなかった。このことは、北アメリカ大陸におけるロドブシン遺伝子異常による ADRP の頻度 25~30%360をはるかに下回る結果である。この点についてひとつ考察しておかなくてはならないのは、今回遺伝子診断スクリーニング法として用いた銀染色による SSCP 法の感度の問題がある。既知の突然変異 DNA 断片を用いた我々の未発表のデータでは、この方法による変異の検出率は約50% であった。この結果を考慮に入れても、日本におけるロドブシン遺伝子異常による ADRPは欧米よりも頻度が低く、たかだか5% 程度なのではないかと考えられる。この点に関しては、なお今後の検討が望まれる。

ペリフェリン/RDS遺伝子については、今回は1家系のみの検出であったが、欧米でもこの遺伝子の異常による網膜色素変性症の頻度はロドプシン遺伝子のそれに比して低く、日本でもほぼ同様の頻度である可能性がある.

遺伝子異常と臨床像との関連については、臨床医学に身を置く者にとって興味深いものである。この分野の検索は遺伝子異常が網膜変性に及ぼす影響を推察できるだけでなく、既知の遺伝子異常を持った患者が将来どのような自然経過をたどるのかを予知できることにより、より正確かつ有効なカウンセリングが可能となるものと思われる。現在、多くの研究者から遺伝子異常と臨床所見との関連についての報告が相次いでおり、この方面での知見の集積が行われている。今後さらに有益な情報が得られることを期待する。

動物モデルを用いた実験では、今回は rds/rds マウスを用いた。その結果、ベリフェリン/RDS 遺伝子異常による視細胞変性過程で視細胞内節にグルタミン酸の蓄積がみられることが明らかになった。 グルタミン酸の働きは多様であり、この事実が即網膜変性機構の解明へとつながるとはいえないにしても、遺伝子異常による網膜変性をさらに細胞の代謝のレベルで考えてゆく上でひとつの示唆を与えるものとなった。 今後、実際にヒトでの遺伝子異常がわかってくると、遺伝子組み換え技術を用いてヒトと全く同じ異常をもつ種々の

網膜変性モデル動物を作成することが可能となる³⁷. 今後は、より疾患に近いモデルを用いて網膜変性機構が解明されてくるものと思われる。そのようなモデル動物の視細胞のグルタミン酸などが測定されれば、今回の結果がどのような意味があったのかという質問に対する解答が与えられるものと思われる。そして、これらの研究の成果が相俟って将来より有効な網膜色素変性症の治療法の開発へとつながらんことを期待する。

稿を終えるにあたり、宿題報告の機会を与えて下さいました日眼評議員、日眼会員の皆様に感謝いたします。本研究に際し、血液やゲノム DNA の送付に協力して頂いた研究協力者の方々に心から感謝の意を表します。また、恩師水野勝義東北大学名誉教授をはじめ、東北大学医学部眼科学教室同窓会の諸先生のご指導とご協力に深謝いたします。本研究には文部省科学研究費補助金(B-03454411, B-05454468)、厚生省特定疾患網膜脈絡膜萎縮症調査研究班および日本失明予防協会から研究助成を受けた。記して謝意を表します。

文 献

- 今泉亀撒:網膜色素変性症。日本の眼科 120:3, 1972.
- 2) 山本覚次, 上野脩幸, 才野恂子, 藤原久子: 網膜色素変性症患者の岡山県に於ける地域分布と年齢分布の特異性に就いて. 厚生省特定疾患網膜色素変性症調査研究班, 昭和50年度研究報告書, 139 —143, 1976.
- 3) 松永 英, 林月 容:網膜色素変性症の遺伝学的 研究. 厚生省特定疾患網膜色素変性症調査研究班, 昭和51年度研究報告書, 119-125, 1977.
- Collins TP: Positional cloning: Let's not call reverse anymore. Nature Genet 1: 3—6, 1992.
- 5) **Dryja TP:** Deficiencies in sight with the candidate gene approach. Nature 347: 614, 1990.
- 6) Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandel DW, et al: A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retintis pigmentosa. Nature 343: 364—366, 1990.
- 7) Kajiwara K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP: Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. Nature 354: 480-483, 1991.
- 8) Farrer GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singh R, Humphries MM, Sharp EM, et al: A three-base pair deletion in peripherin/RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. Nature 354: 478—480, 1991.
- 9) Bascom RA, Kalnins VI, Molday RS, McInnes

- RR: Molecular cloning of the cDNA for a novel photoreceptor-specific membrane protein (ROM-1) identifies a disk protein family complicated in human degenerative retinopathies. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 946, 1992.
- 10) Blanton SH, Heckenlively JR, Cottingham AW, Friedman J, Sadler LA, Wagner M, et al: Linkage mapping of autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP1) to the pericentric region of human chromosome 8. Genomics 11: 857—869, 1991.
- 11) Inglehearn CF, Carter SA, Keen TJ, Lindsey J, Stephenson AM, Bashir R, et al: A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 7p. Nature Genet 4:51 -53, 1993.
- 12) Jordan SA, Farrar GJ, Kenna P, Humphries MM, Sheils DM, Kumar-Singh R: Localization of an autosomal dominant retinitis pigmentosa gene to chromosome 7q. Nature Genet 4: 54-57, 1993.
- 13) Rosenfeld PJ, Cowley GJ, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. Nature Genet 1: 209-213, 1992.
- 14) McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: Recessive mutations in the gene encoding the β-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. Nature Genet 4:130—134, 1993.
- 15) Nakazawa M, Kikawa-Araki E, Shiono T, Tamai M: Analysis of rhodopsin gene in patients with retinitis pigmentosa using allelespecific polymerase chain reaction. Jpn J Ophthalmol 35: 386—393, 1991.
- 16) Dryja TP, McGee TL, Hahn LB, Cowley GS, Olsson JE, Reichel E, et al: Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. N Engl J Med 323: 1302—1307, 1990.
- 17) Watanabe Y, Kawasaki K, Miki N, Kuo CH: Isolation and analysis of the human MEKA gene encoding a retina-specific protein. Biochem Biophys Res Commun 170: 951—956, 1990.
- 18) Nakazawa M, Kikawa-Araki E, Shiono T, Tamai M: Analysis of rhodopsin gene in patients with retinitis pigmentosa using polymerase chain reaction. In: Shimizu K (Ed): Current Aspects in Ophthalmology. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 865—870, 1992.

- 19) **Orita M, Suzuki T, Sekiya T, Hayashi K:**Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. Genomics 5: 874—879, 1989.
- 20) Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackie MB: Diagnostic single strand conformational polymorphism (SSCP): A simplified nonradioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. Nucl Acid Res 19: 405—406, 1991.
- 21) Nakazawa M, Kikawa E, Chida Y, Shiono T, Tamai M: Nonradioactive single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): A simplified method applied to a molecular genetic screening of retinitis pigmentosa. In: Hollyfield JG, et al. (Eds): Retinal Degeneration: Clinical and Laboratory Applications. Plenum Publishing Corp, New York, 1993 (in press).
- 22) Scheffield VC, Fishman GA, Beck JS, Kimura AE, Stone EM: Identification of novel rhodopsin mutations associated with retinitis pigmentosa by GC-clamped denaturing gradient gel electrophoresis. Am J Hum Genet 47: 699 —706, 1991.
- 23) Keen J, Lester D, Inglehearn, C, Curtis A, Bhattacharya S: Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink gels. Trend in Genet 7: 5, 1991.
- 24) Wallece DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, et al: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science 242: 1427—1430, 1988.
- 25) Nakamura M, Fujiwara Y, Yamamoto M: Homoplasmic and exclusive ND4 gene mutation in Japanese pedigrees with Leber's disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 488—495, 1993.
- 26) McInnes RR, Bascom RA: Retinal genetics: A nullifying effect for rhodopsin. Nature Genet 1: 155—157, 1992.
- 27) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487 —491, 1988.
- 28) 堀田善裕, 塩野 貴, 早川むつ子, 橋本敏浩, 金井 淳, 中島 章, 他:日本人の常染色体優性網膜色素 変性患者のロドプシン遺伝子の分子生物学的検 討. 日眼会誌 96:237-242,1992.
- 29) Shiono T, Hotta Y, Noro M, Sakuma T, Tamai M, Hayakawa M, et al: Clinical features of Japanese family with autosomal dominant

- retinitis pigmentosa caused by point mutation in codon 347 of rhodopsin gene. Jpn J Ophthalmol 36: 69—75, 1992.
- 30) Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Dryja TP: Ocular findings in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and rhodopsin, proline-347-leucine. Am J Ophthalmol 111: 614—623, 1991.
- 31) Nichols BE, Sheffield VC, Vandenburgh K, Drack AV, Kimura AE, Stone EM: Butterfly-shaped pigment dystrophy of the fovea caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene. Nature Genet 3: 202—207, 1993.
- 32) Kajiwara K, Sndberg MA, Berson EL, Dryja TP: A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punstata albescens. Nature Genet 3: 208—212, 1993.
- 33) Wells J, Wroblewski J, Keen J, Inglehearn C, Jubb C, Eckstein A, et al: Mutations in the

- human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. Nature Genet 3: 213—217, 1993.
- 34) Ulshafer RJ, Sherry DM, Dawson Jr R, Wallace DR: Excitatory amino acid involvement in retinal degeneration. Brain Res 531: 350-354, 1990.
- 35) Kanno C, Ishiguro S, Shiono T, Kikuchi M, Tamai M: Decrease of opsin content in the developing rat photoreceptor cells by systemic administration of L-glutamate. Cell Structure and Function 16: 399-403, 1991.
- 36) Dryja TP: Doyne Lecture. Rhodopsin and autosomal dominant retinitis pigmentosa. Eye 6: 1-10, 1992.
- 37) Olsson JE, Gordon JW, Pawlyk BS, Roof D, Hayes A, Molday RS, et al: Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): A mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Neuron 9: 815—830, 1992.