

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592051

研究課題名（和文） 網膜変性疾患の分子生物学的並びに電気生理学的研究

研究課題名（英文） Molecular biological and electrophysiological study of retinal degenerations

研究代表者

直井 信久（NAOI NOBUHISA）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50211412

研究成果の概要(和文): 網膜色素変性症患者では原因となる遺伝子変異が認められることがあるがその頻度は1-2割と高くない。われわれは主としてX連鎖性網膜色素変性症の患者において、遺伝子解析を行い、RPGR 遺伝子で遺伝子変異が多発することを見だし、電気生理学的検査を交え、遺伝子変異の意義を考えた。また網膜色素変性症では黄斑円孔が合併することがある。黄斑円孔手術は色素変性の患者においても必要な手術であることを報告した。

研究成果の概要(英文): We investigated the gene mutations in X-linked retinitis pigmentosa patients. We have found most of them have gene mutations in ORF15 of RPGR gene. We also studied macular holes associated with retinitis pigmentosa. We found efficacy of vitreous surgery in these patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学・眼遺伝学

キーワード：網膜色素変性症、網膜電図、遺伝子、電気生理、視野

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は夜盲と視野狭窄を特徴とする遺伝性の難治疾患であり、進行すると重篤な視力障害を引き起こす。日本人における発症頻度は3000人-5000人に1人、成人中途失明原因の第4位に位置し社会的にも重要な疾患である。その原因は長らく不明とされていたが、最近の分子生物学、遺伝学の発展により、本疾患の原因についても解明されつつある。

[われわれのこれまでの研究成果]

X連鎖性網膜色素変性症(XLRP)は網膜色素変性症の中でも最も重症型である。われわれは

このX連鎖性網膜色素変性症に注目し、日本人網膜色素変性症家系について調査を行いその中で見いだされたX連鎖性色素変性の可能性のある37家系を収集し、視力、眼底所見、網膜電図や視野を詳細に検討すると同時に、Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator(RPGR)やRP2遺伝子の直接塩基配列決定を行い、4家系にRPGRのORF15の3種類のミスセンス変異を同定し、アジア人においてもRPGRのORF15が好発変異部位であることを見いだした。また1家系でRP2変異を見出した。(Mol. Vis.,2006)さらに直接塩基配列決定法で変異を同定できなかった家

系に対しては、サザンブロット解析を行い、RPGR の 30kb におよぶ macrodeletion を初めて同定した。(Mol. Vis., 2005) さらに本来キャリアであるべき発端者の母親に変異が見出されなかったことから毛母細胞、類粘膜細胞を採取しその遺伝子型を決定することにより、RPGR 遺伝子で最も頻発する変異である g. ORF15+652-653 del AG 変異で somatic-gonadal mosaicism が弧発性色素変性の一部の原因となっていることをはじめて提示した。(Am. J. Med. Genet., 2007 Oct12 Epub) また XLRP の一家系で ORF15 の 3' 末端の変異を初めて見だし ORF15 コーディング領域と臨床症状との関連を論じた。(Arch. Ophthalmol.

2007) このようにわれわれの研究の特徴は単に多数の症例を収集して遺伝子解析の頻度を出すだけでなく、個々の症例できめ細やかに解析を行い表現型と併せて疾患を理解していくという点を主眼にしている。

2. 研究の目的

(1) RPGR タンパクの発現と局在の解析

ポリクロナルとモノクロナルの両方の抗体を用いて RPGR タンパクの発現と細胞内局在を決定する。これには成熟した網膜と、胎児も含めた発達期網膜を用いて比較する。

(2) RPGR タンパクと相互干渉を起こし複合体を形成するタンパクの同定と機能の解明
まず yeast two-hybrid strategy を用いて RPGR タンパクと相互干渉を起こすタンパクを見出す。次に GST プルダウンアッセイと co-immunoprecipitation 分析を用いて相互作用を特定する。またイムノアフィニティ抽出を用いるクロマトグラフィで網膜より RPGR を含んだ複合物を抽出し、その生化学的性質を調べる。

(3) RPGR の conditional null mutation マウスを用いた RPGR タンパクの機能解析
Cre/lox システムによる視細胞や網膜色素上皮のコンディショナルなノックアウトマウスを用いて RPGR の生物学的な機能を解析する。

(4) 臨床患者における RPGR 遺伝子の分子生物学的、電気生理学的解析

RPGR 遺伝子異常をもつ色素変性症はキャリアの近視が強く、表現型にも特徴があるので、標準化された網膜電図、黄斑機能を解析するための黄斑局所網膜電図、多局所網膜電図を組み合わせて、RPGR 遺伝子変異がある群と無い群で電気生理学的な差異が見られるかどうか調査する。

3. 研究の方法

(1) RPGR タンパクの発現と局在の解析

ポリクロナルとモノクロナルの両方の抗体を用いて(入手済) RPGR タンパクの発現と

細胞内局在を免疫組織化学的に決定する。これには成熟した網膜と、胎児も含めた発達期網膜を用いて比較する。設備は当学部の電顕センター他の共同利用施設を利用する。

(2) RPGR タンパクと相互干渉を起こし複合体を形成するタンパクの同定と機能の解明
まず出芽酵母を用いた two-hybrid スクリーニング法を用いて RPGR タンパクと相互干渉を起こすタンパクを見出す。次に GST プルダウンアッセイと co-immunoprecipitation 分析を用いて相互作用を特定する。さらにイムノアフィニティ抽出を用いるクロマトグラフィで網膜より RPGR を含んだ複合物を抽出し、その生化学的性質を調べる。設備は当大学のフロンティア実験センターの設備を利用する。

(3) 臨床患者における RPGR 遺伝子の分子生物学的、電気生理学的解析

A. 患者調査

問診および診察により男性より男性への伝搬が無く、男性患者の症状が女性患者の症状に比し重篤である、あるいは高度近視を伴うなど X 連鎖性網膜色素変性症の可能性があると判断された患者をスクリーニングする。

患者ならびにその血縁者より血液を採取する。患者は宮崎大学医学部付属病院、宮崎中央眼科病院ほか宮崎県内の眼科施設、および全国の協力病院より紹介された患者を対象とする。X 連鎖性網膜色素変性症の疑いのある患者及びその血縁者約 100 名の試料収集を目標とする。

電気生理学的検査 X 連鎖性網膜色素変性症はその軽重に幅があり、特に女性患者(キャリア)の場合には罹患するか否かの判断に迷うことも多い。そのような場合には電気生理学的検査を施行し、罹患しているか否かをはっきりさせる。これまでの研究では男性患者では網膜電図は全ての記録で強く障害されており、女性キャリアでは症状が無くとも網膜電図各成分が正常の 1/2 からそれ以上の振幅に低下しているのでこの所見から X 連鎖性網膜色素変性症の家系を見出すことが可能である。

B. 遺伝子解析

患者から採取した血液より DNA を抽出する。

RPGR 遺伝子エクソン ORF15 とエクソン 1-15a に対応したプライマー を作製し、ホットスタート用酵素のキットを用いてサーマルサイクラー(新規設備)により PCR 法による増幅を行う。得られた fragment はダイナーミネーター法サイクルシークエンスキットを用いてシークエンス反応を行い、ゲルカラム精製後、ABI ジェネティックアナライザー 3100(現有装置)で直接塩基配列決定を行い、変異の有無を正常者の配列とのホモロジーを解析して調査する。

遺伝子に大きな欠失がある場合、上記の直接塩基配列決定では変異の同定が困難である。

上記方法で PCR 法による増幅を行った後、得られた反応液で電気泳動を行うと、大きく欠失している部位は増幅されず、泳動像が確認されない。これにより、欠失のおおまかな部位の見当をつける。その後、欠失部位に該当するプローブを作製し、放射性同位体にてラベルする。適当な制限酵素で処理した該当検体と正常人の DNA にてメンブレンフィルター作製後、プローブとハイブリダイゼーションを行い、シグナルの出現の状況により欠失を確認する。

4. 研究成果

網膜色素変性症の患者に伴う病態として黄斑円孔の合併がある。4名の黄斑円孔を伴った色素変性症患者の ERG、視野、眼底、Bスキャン、超音波所見、OCT所見を retrospective に検討した。その結果全員で OCT で全層円孔が認められた。全例で内境界膜剥離を伴う全層円孔手術を行った。3名で視力の向上をみた。1名では視力は不変であった。以上の結果から黄斑円孔手術は色素変性の患者においても必要な手術であることを報告した。(Jin ZB et al. Retina, 2008, 28, 610-4)

また heterozygous な変異において allelic copy number variation は機能異常に結びつく可能性がある。われわれは FSCN2 変異をもつ患者と正常人においてこれを検討した。実験は3名の c.72delG の変異を持つ患者と、変異を持つ正常人および持たない正常人で allele copy 数を検討した。その結果、3名の患者と3名の正常人では等しい数の copy 数が認められた。他の1名の患者では野生型 allele は変異型 allele の4倍の copy 数が認められた。さらに allele specific methylation 分析を行ったところ、methylation は random に行われていることがわかった。その結果 allelic copy number variation は色素変性症と合併しておらず、c.72delG は色素変性の主因であると考えられることは出来ないと結論した。(Jin ZB et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008, 49; 3799-805)

X連鎖性網膜色素変性症の患者では引き続き RPGR 遺伝子、exon ORF15 領域を中心に遺伝子検索を行った。また、先天性網膜分離症の RS-1 遺伝子変異を持つ家系を見だし、その一症例に内境界膜剥離を伴う硝子体手術を行った。それにより網膜分離の形態は著明に改善し、また視力低下が止まるだけでなく、若干の改善をみた。これは遺伝子で確認された網膜分離症で外科的治療が行われ、改善をみた最初の例である。

また網膜機能を大きく減弱させる網膜症として未熟児網膜症に着目し、ベヴァシズマブを投与することにより光凝固を行わなくとも、未熟児網膜症を治癒させることができることを報告した。これは未熟児網膜症の新しい治療法になる可能性が高い。

網膜色素変性症では主に視細胞、網膜色素上皮の変性が注目され、網膜内層である網膜神経節細胞や神経線維層はあまり注目されてこなかった。しかし最近の電気生理学的あるいは形態学的研究によって必ずしもそうではなく、網膜内層にも変化が及んでいることが報告されてきている。われわれは昨年引き続き、電気生理学的な方法のみならず、光干渉断層計 (OCT) を使用して網膜内層の層別の形態を解析している。遺伝子情報と合わせて、どのような変異を持つ症例が内層の変性が大きいかを検討してきた。将来人工網膜刺激装置が実用化された時に網膜内層の機能が残っていないと視機能が得られないことが予想されるが、本研究によりその判別ができつつある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Jin ZB, Mandai M, Homma K, Ishigami C, Hiramami Y, Nao-I N, Takahashi M: Allelic copy number variation in FSCN2 detected using allele-specific genotyping and multiplex real-time PCRs, Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有, 49(9):3799-3805(2008)

Jin ZB, Gan DK, Xu GZ, Nao-I N, Macular hole formation in patients with retinitis pigmentosa and prognosis of pars plana vitrectomy, Retina, 査読有, 28(4): 610-614(2008)

河野尚子、中馬秀樹、齋藤真美、中馬智巳、直井信久、杉本哲朗、是枝麻子：両側性朝顔症候群にもやもや病を合併した1例、臨床眼科、査読有、63(13):1927-2931(2009)

[学会発表](計14件)

中馬智巳、井上由希、小澤摩記、中馬秀樹、直井信久：BRVOの嚢胞様黄斑浮腫に対する硝子体手術とBevacizumab硝子体注入の治療効果の比較、第62回日本臨床眼科学会(2008.10.26)東京

小澤摩記、中馬智巳、直井信久：加齢黄斑変性症に対するBevacizumab併用光線力学的療法の6か月目の成績、第62回日本臨床眼科学会(2008.10.26)東京

小澤摩記、荻野展永、川原亮輝、中馬秀樹、直井信久：網膜中心静脈閉塞症に対

するモンテプラーゼ注入術後の眼圧上昇、第32回日本眼科手術学会総会
(2009.1.23)神戸

直井信久、川原亮輝、大久保陽子、福島慶美、中馬秀樹：活動期末熟児網膜症に対するbevacizumab硝子体内投与の効果、第65回日本弱視斜視学会総会・第34回日本小児眼科学会総会合同学会
(2009.6.5)大阪

直井信久：Vesicular pigment epitheliopathyについて、Japan Macula Club 第11回総会(2009.8.23)蒲郡
Maki Kozawa, Nobuhisa Nao-i: Comparison of Outcomes After Indocyanine Green-and Brilliant Blue G-Assisted Internal Limiting Membrane Peeling During Macular Hole Surgery, American Academy of Ophthalmology 2009 Joint Meeting, (2009.10.26), San Francisco

小澤摩記、杉本貴子、直井信久：Rs1の変異を認めたX連鎖性若年性網膜分離症における硝子体手術と遺伝子検索の意義、第48回日本網膜硝子体学会総会・第26回日本眼循環学会(2009.12.5)名古屋

直井信久：未熟児網膜症の治療について、第80回九州眼科学会(2010.5.28)佐賀
直井信久：未熟児網膜症の治療について、第21回愛知眼科フォーラム(2010.9.12)愛知

福島慶美、川原亮輝、高田真知、中馬秀樹、直井信久：活動期末熟児網膜症に対するbevacizumab硝子体内投与の効果、第66回日本弱視斜視学会総会・第35回日本小児眼科学会総会合同学会(2010.7.2)東京

直井信久：未熟児網膜症の治療、Japan Macula Club 第12回総会(2010.8.21)愛知

小澤摩記、河野尚子、直井信久：網膜色素変性に対する黄斑手術により視力低下をきたした2例、第33回日本眼科手術学会総会(2010.1.22)東京

小澤摩記、中馬秀樹、直井信久：網膜下出血の原因疾患および抗凝固剤、抗血小板剤内服の及ぼす影響についての検討、第49回日本網膜硝子体学会総会・第16回日本糖尿病眼学会総会(2010.11.27)大阪

小澤摩記、中馬秀樹、河野尚子、直井信久：高眼圧により網膜虚血を生じ緑内障手術で改善した1例、第34回日本眼科手術学会総会(2011.1.28)京都

〔図書〕(計2件)

直井信久：中山書店、眼科診療のコツと

落とし穴 手術 - 後眼部・眼窩・付属器(2008)15-15
直井信久：医学書院、今日の治療指針(眼科救急疾患)(2011)1257-1258

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

直井 信久 (NAOI NOBUHISA)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：50211412

(2) 研究分担者

中馬 秀樹 (CHUMAN HIDEKI)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号：20244204

河野 尚子 (KAWANO NAOKO)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：00336306

(3) 連携研究者

研究者番号：