

## 網膜色素変性：遺伝カウンセリングと病態研究



医療と技術

辻川 元一\*

Retinitis Pigmentosa : genetic counseling and disease mechanism

Key Words : Retinitis Pigmentosa, Photoreceptor

網膜色素変性は罹病率 4000 人に一人と指定難病の中で最も多く認められる疾患の一つであり、眼科医であれば必ず遭遇する疾患である<sup>1)</sup>。遺伝性疾患であり、そのほとんどがメンデル遺伝形式をとるが、原因遺伝子の数が 80 を超えて報告されるほど、遺伝子座異質性が存在する疾患群ととらえることができ、家系により遺伝形式は異なる。また、家系内においてでさえ、臨床的異質性が存在し、重症、軽症が混在することがある。また、明確な遺伝子型と表現型の対応もないと思われ、複雑な患者スペクトルを持つ疾患でもある。患者は Rod 視細胞優位の視細胞死を示すことから、夜盲や視野狭窄の自覚で発症するが、中心視力は中期以降も保たれている場合も多い。この点後に議論する。

網膜色素変性の臨床を行っている患者から必ずと言ってきかれる質問が二つある。一つは家系内再発と遺伝学的に言われるもの、つまり、家系の中で、特に自分の子供が、やはり、網膜色素変性になってしまうのではないか、その確率はいかほどかという疑問。もう一つは、見るという行為自体が、自分の病態を悪くしてしまうのではないか。光が目が悪くしてしまうのではないかという疑問である。

一つ目の疑問については、網膜色素変性が疾患の集合体であり、ありとあらゆる遺伝形式をとることが問題となるが、普通、家系図より、(もしくは原因

遺伝子の検索により) 遺伝形式を決定、そこから類推することになる。また、経験的な再発率も研究されており、孤発例の兄弟では男女で差があるがおよそ 1% から 4% である<sup>2)</sup>。しかし、おそらく広く行われている、優性遺伝であれば(浸透率を考慮して) 子供が発症する確率は約 40% (病因染色体を遺伝する確率 50% x 浸透率約 87% で約 40%)、劣性遺伝であれば次子が発症する確率は 25% という説明は、家系からの情報を有効に活用していない可能性が高い。なぜなら、網膜色素変性は晩発性の疾患であり、遺伝子型は受精時に決定されてしまうが、表現型は(少なくともそれが明らかになるまでは) 発症時までには決定しないからである。極端な例でいえば常染色体劣性遺伝の家系においても 90 歳で未発症と思われる患者兄弟が、今後発症する可能性は上記の 25% よりはるかに小さいことは容易に理解される。しかし、どれほど、減少するのか答えてあげられなければ説得力がない。

一般に神経の変性疾患のような遅発性の疾患において、この家系内再発率の問題を解決するためには発症と年齢の関係を規定した発症年齢曲線が使われる。しかし、これまで、網膜色素変性の発症年齢曲線は知られていなかった。そこで我々は大阪大学医学部と東北大学医学部の症例を用いて網膜色素変性の発症年齢曲線を策定した<sup>3)</sup>。使用した症例は 370 例、発症の年齢は診断の年齢とし、患者が網膜色素変性の病名を告げられた年齢を用いた。症例の 14% が常染色体優性遺伝、25% が常染色体劣性遺伝、3% が X 連鎖性劣性遺伝形式と考えられ、この割合は以前の報告と酷似していた。このように、網膜色素変性は数々の疾患の集合体であるにもかかわらず、全体として発症年齢曲線は出生から 65 歳まではほぼきれいな直線状を示して発症率は増加し、それ以降は微増にとどまった。一次関数で近似を試みると

\* Motokazu TSUJIKAWA

1968年9月生まれ  
大阪大学 大学院医学系研究科  
(2001年)  
現在、大阪大学 医学部 保健学科  
発生再生医学 教授 医学博士 眼科学  
TEL : 06-6879-3456  
FAX : 06-6879-3458  
E-mail : moto@sahs.med.osaka-u.ac.jp



$y = 1.4605x$  となり、このときの相関係数は  $R^2 = 0.9821$  と非常に高いものであった (図1)。これにより、上述の疑問にはかなり答えることができるようになった。また、疾患全体において、全体で発症する年齢は平均35.1歳、中央値では36.5歳であった。このことは若い世代では発症率がかなり低いことを意味する。一般に、常染色体劣性遺伝の方が優性遺伝形式のものより重症となりやすいと言われているが、遺伝形式別に検討しても発症年齢曲線に大きな違いは認められなかった。常染色体優性遺伝形式では発症する年齢は平均36.9歳、中央値では40歳、常染色体劣性遺伝形式では平均36.2歳、中央値では40歳であり、統計学的に有意な差はなかった。ただし、X連鎖性劣性はサンプルの数が少なく検討は出来なかった。

この発症年齢曲線を使用した家系内再発の問題の解決を例を挙げてみていきたい。まずは先の例に挙げた図1に示すような劣性遺伝形式の家系において非発症者である構成員、患者の兄弟が今後発症する確率を考えてみたい。その確率は、 $y = 0.25(1 - f(x)) / (0.25(1 - f(x)) + 0.75)$  であり、ここで  $f(x)$  は  $x$ : 年齢における発症率で発症年齢曲線で与えられる。出生時  $x = 0$  の場合は、遺伝子型のみを想定した従来のもと同様  $y = 0.25$  となるが、この数値は年齢とともに漸減していき30歳では15.5%、60歳では2.8%となり、以降では極めて低くなる。ただし、

対象の年齢が10歳の場合は22.9%、20歳でも19.7%と年齢が若いときには、自身が今発症していないという事象は、今後の発症率にあまり影響しないことも見て取れる。次に、よりカウンセリング上重要な常染色体優性遺伝の家系について例を挙げる。実際の例であるがカウンセラーは自分の兄弟と父が網膜色素変性であるとき、自身が保因者であるかどうか、つまり、自分の子供に遺伝するかどうかを知りたい。家系から言っても優性遺伝形式であることはほぼ間違いなく、保因者であった場合は自身の子供が発症する確率が跳ね上がることになる。ここで単に遺伝子型の計算から保因者である確率50%とするのは、30まで発症しなかったという条件を無視してしまっている。しかし、優性遺伝形式での浸透率87%をうのみにして、発症していないのに保因者である確率 / 色素変性を発症していない確率 =  $0.5 \times (1 - 0.87) / [0.5 + 0.5 \times (1 - 0.87)] = 0.115$  とするのは感覚的に言っても低く見積もっていると理解できる。実際の解はBayesの定理を用いて計算される。このカウンセラーが保因者である事象を  $H_0$ 、保因者でない事象を  $H_1$ 、カウンセラーが優性の遺伝変異を持っている事象を  $E$  とすれば  $P(H_0 | E) = P(H_0) \times P(E | H_0) / [P(H_0) \times P(E | H_0) + P(H_1) \times P(E | H_1)]$  である。

ここで  $P(H_0) = P(H_1) = 0.5$   $P(E | H_0)$  はカウンセラーが保因者であるもとで遺伝変異を持っている確

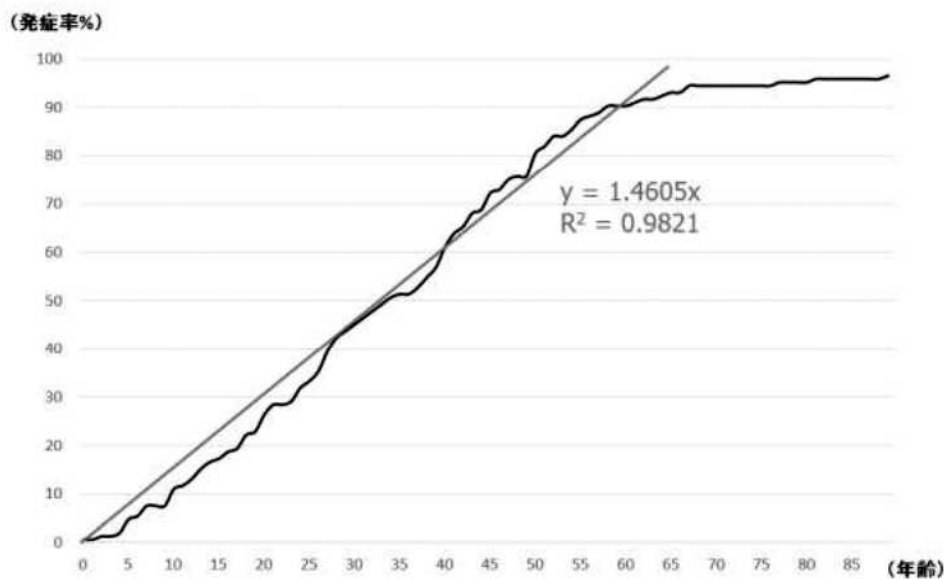


図1：網膜色素変性の発症年齢曲線 発症率はほぼ直線状に増加する

率、つまり遺伝変異を持っているのに発症していない確率なので  $(1 - f(x))$ 。したがって、 $P(H_0 | E) = 0.5 \times [1 - f(x)] / \{0.5 \times [1 - f(x)] + 0.5 \times 1\} = [1 - f(x)] / [1 - f(x) + 1] = [1 - f(x)] / [2 - f(x)]$  となる。ここで、年齢を考慮しない浸透率 0.87 を  $f(x)$  に代入すれば、先ほどの値 0.115 が出てくる。年齢を考慮し発症年齢曲線から  $f(x) = 0.272$ ,  $x = 30$  を代入すると  $P(H_0 | E) = 0.421$ 、つまり 42% の確率で発症していても保因者である可能性がある。仮に 45 歳とすれば  $f(45) = 0.5655$  から  $P(H_0 | E) = 0.303$  となる。これら発症年齢曲線を使用した値の方がより現実的であることは容易に理解されよう。近年になり、遺伝カウンセリングの重要性は増すばかりであるが、網膜色素変性においては以上のようなことを考慮しなければならない。

### 光（環境）と細胞死（遺伝的プログラム）の関係

二つ目の疑問も患者にとって切実である。本疾患において重要なのは発症時には良好な視機能が保たれており、患者が生活に不自由を感じることは少ないが、その後、長い年月をかけ、患者の QOL が阻害されていき、ついには失明に至ることもあるという点である。

上記の研究でも平均の発症年齢は 35 歳である。すなわち、2 次予防、進行の抑制が可能であれば、患者の QOL 向上に寄与することが大きい疾患である。裏返して言えば、進行を加速するような環境因子があるならばそれを排除したいというのは当然の考えで、患者にとって光というものが最も身近に考えられうる因子であり、心配の種なのである。この疑問については臨床的にも、実験的にもいろいろなことが言われている。二つほど例を挙げるなら、1980 年に Berson が発表した研究では網膜色素変性の患者二人の片眼に遮光のための強膜コンタクトを一日 6-8 時間、5 年間にわたり装用し、両眼の進行度を比較したのがある。結果は大きな差異なく、両眼とも同様の進行を示したのだが、そのうえでも彼はサングラスや遮光コンタクトの使用を推薦している<sup>4)</sup>。また、実験動物を使った研究において、2002 年 Hao 等は光による視細胞障害には、いわゆる光障害を起こすような強い光によるものと、通常の光によるものは違うメカニズムに起因し、後者のものは光受容反応が視細胞死シグナルを引き起こすと述べて

いる<sup>5)</sup>。この疑問に関して、我々の立場は遺伝子を使った基礎実験から光はやはり有害であるという考えである。この場合、光というのは Hao が言うところの弱い光であり、正常では光毒性を起こすような強い光でもなく、また、エネルギーが高い青色光である必要もない。通常の見えるという光刺激が視細胞死のシグナルを引きうるということである。我々は視細胞死を引き起こす二つの遺伝学的ゼブラフィッシュモデルにおいて視細胞死が光感受性であることを見出した<sup>6),7)</sup>。この二つの変異体の一つは *ovl* といわれるゼブラフィッシュに変異物質 ENU を作用させて変異を導入した変異体の一つであり、これについては後で詳しく述べる。もう一つの変異はヒトの網膜色素変性の代表的変異ロドプシンの Q344X 変異を導入したヒトロドプシンをゼブラフィッシュの Rod 視細胞に強制発現させたトランスジェニック体である。この二つの魚はヒトの網膜色素変性と同様、Rod 視細胞優位の視細胞死を示すがこれらの視細胞死は光を抑制した条件下では抑制され、光を常にあてた状態ではたとえその光が正常視細胞には影響を与えないような程度の光であっても、視細胞死を強く促進していた。

それでは、臨床において光を避ければよいのかというと、これは言うほど簡単ではない。避けるべきは強い光だけでなく、普通の光であるのでこのような遮蔽を日常的に行うのは非常に難しいことと、ヒトの Rod 視細胞はただ 1 つの光子をも補足することができるので、遮蔽自体が難しいことがあげられる。例えば、掌で目を強くふさいでも光を感じることができるのは日常でも経験するところである。つまり、日常において環境要因、光の遮断は困難であり、私も患者指導においては夏の日差しのような強い光は避けるようにとするとどめている。

### 光（環境）の下流で何が起きているか

ここで、通常、環境因子光の遮断が困難であるのなら、次に、その下流での光の効果を遮断することはできないのであろうか？ そのためには疾患視細胞においてどのように光感受性の視細胞死が起こっているかを知る必要がある。我々は光感受性の視細胞死を示す *ovl* を用いてこのメカニズムを検討した<sup>6)</sup>。*ovl* は網膜の変性、腎臓の嚢胞、体軸の湾曲の 3 主徴を特徴とするゼブラフィッシュ変異体であり、網

膜の変性、腎臓の嚢胞よりヒトのBBS症候群のモデルとされている<sup>8),9)</sup>。我々はまず、ポジショナルクローニングによりこの*ovl*をコードしている遺伝子がIFT複合体のうちのIFT88であることを見出した。視細胞はその構造に特徴があるが、特に目を引くのは外節の存在である。外節は光受容のための反応、光受容反応が起こるDiscの集合体であるが、この外節は構造的には繊毛(Cilia)が変形したものである。したがって、外節と内節の付け根の部分は解剖学的にもConnecting Ciliumと呼ばれており、微小管が2つ重なったものが9つ存在する独特の構造を持つ。IFT複合体はこのCiliaの部分の輸送にかかわる分子群である。視細胞では1日に $10^9$ のロドプシン分子が生産されるといわれている。これらの分子は細胞体にある小胞体で合成されるため、Connecting Ciliumを通して外節に輸送されることとなる。この輸送を担っているのがIFT複合体ということになる<sup>10)</sup>。我々はIFT88がない状態、つまり、*ovl*においては感覚器受容体細胞においてCiliaは発生するが、その維持ができず、早期に消退することを見出した<sup>6)</sup>。しかし、この時期の視細胞の電子顕微鏡による観察では外節の消失は認めたものの、あとに述べる変化を除いて、視細胞はおおむね正常に思われた。しかし、この外節、Ciliaの消失後、感覚器需要細胞はアポトーシスを引き起こし、急速に脱落し始める<sup>6)</sup>。一体、視細胞では何が起きているのであろうか。

*ovl*においては外節が消失してしまうため、ロドプシンなどの視物質は外節に局在することができず、細胞体に蓄積する<sup>6)</sup>。先の電子顕微鏡での観察においても、*ovl*視細胞においては外節が消失しているとともに細胞体の側壁部分にDisc構造のような層状構造が認められた。このような構造の有無は定かではないが、このような視物質の細胞体膜への蓄積(異所性蓄積)は、視細胞死をきたす多くの疾患、網膜色素変性だけでなく、網膜剥離、加齢黄斑変性などでも報告されている。そこで我々は、まず、このロドプシンの異所性の蓄積が視細胞死に関連があるのかを検討した。この検討は蓄積するロドプシン分子の発現を抑制する(ノックダウン)の手法を用いて行った<sup>6)</sup>。*ovl*変異体においてロドプシンの発現を抑制すると、Rod視細胞死の数は優位に減少した。この効果はロドプシン抑制に無関係なCone視

細胞においては効果を認めなかった。すなわち、ロドプシンの細胞体への蓄積は視細胞に対して促進的であると考えられた。次に、このロドプシンの細胞体への蓄積自身が問題なのか、あるいはロドプシンが細胞体において活性化されることが問題なのかという疑問が生じる。これについては、先に述べたように*ovl*における視細胞死が光感受性を示すこと、つまり、野生型においては影響のないような光照射でも視細胞死を促進することから、細胞体のロドプシンが活性化されること、すなわち、異所性のフォトトランスダクションの開始が視細胞死に影響を与えていると考えられる。つまり、視細胞は光受容反応によるシグナル伝達により死んでいると考えられた<sup>7)</sup>。

それでは光受容反応のどこまでが視細胞死にかかわっているのであろうか?周知のとおり光受容反応はロドプシンから、トランデュースン(TD)、フォスフォジエステラーゼ(PDE)とシグナルが伝わり、細胞内のcGMPの減少によりcGMP依存性のカチオンチャンネルが閉鎖されることによって完成される。このうち、どの分子までが視細胞死にかかわっているのであろうか?この疑問に答えるため、我々は*ovl*において光受容反応の分子を順に発現抑制(ノックダウン)して、視細胞死への影響を検討した。まず、TDをノックダウンした場合、ロドプシンをノックダウンした場合のように視細胞死は抑制された。しかし、次のPDEをノックダウンしても視細胞死の数について変化は認められなかった。すなわち、視細胞死のシグナルにおいてはTDまでは含まれるが、PDEは含まれないということになる<sup>7)</sup>。つまり、光受容反応はTDにおいて視細胞死のシグナルに接続していることになる。それではこの視細胞死のシグナルとは一体何であろうか?

このシグナルが活性化される引き金が何かということをもう一度考えてみると、ロドプシンが外節ではなく細胞体の膜に異所性にあり、それが活性化されることにある。つまり、ロドプシンの局在が変化した、場所が問題であると考えられる。つまり、先の実験からTDにより活性化される分子は通常は外節には存在しないが、細胞体には存在し、正常ではTDと共局在しないが、*ovl*のような状態であるとTDと共局在し、活性化されると考えれば矛盾をきたさない。また、局在以外の特徴としては、ロドプ

シンはGタンパク共役受容体の一つであり、TDはGタンパク、PDEはエフェクターという薬理学的特徴を持つ。

このことから我々が探している分子はPDEのようにGタンパクにより活性化されるエフェクターの一つであるとも予想できる。我々はこのようなエフェクター分子の局在を免疫組織化学で検討していった。するとアデニル酸シクラーゼ (AC) は視細胞で発現しているが、細胞体の膜には局在しているが、外節における発現は認められなかった。そこでACの阻害剤を *ovl* に使用したところ、視細胞死を抑制した。また、ACの活性化剤においては正常視細胞においても視細胞死を導入することができた<sup>7)</sup>。

この検討は薬剤を使った検討でありこれらの効果がACに特異的であるという根拠が薄い。しかし、発生段階においてACの発現を遺伝学的に抑制してしまう事は毒性が強すぎると予想される。そこで、さらにACの視細胞死への影響を検討するため、ロドプシンの局在異常がなくともACの活性化を引き起こしうる実験系を作出した。*ovl* においてはロドプシンが外節ではなく細胞体に蓄積するためACが活性化されると考えた。今回の系では逆に通常では外節に存在していないACを強制的に外節に発現させる系を検討した。ロドプシンのC末端7つのアミノ酸基はロドプシンの光受容という機能には関与しない。このペプチド残基はロドプシンを細胞のアピカル側から外節への投射に関与する。この残基を例えばGFPのC末端にフュージョンさせるとGFPを外節に強制的に投射させることが出来る。我々はこの性質を利用して二つのACトランスジェニック・ゼブラフィッシュを作成した。一つは定法のロドプシンプロモーター下にヒトACを発現させるRod強制発現体。もう一つは同様にロドプシンプロモーター下にACを発現させるのは同様だがこのACはC末端にロドプシン7塩基を結合したものである。この二つのトランスジェニック体の視細胞での発現局在を検討すると、予想通り、ロドプシン7末端 (Tail+ と呼ぶ) がある場合、ACは通常では発現しない外節に投射しているが、通常のACトランスジェニック (Tail- と呼ぶ) ではACでの外節での発現はなかった<sup>7)</sup>。これらのトランスジェニック体と正常視細胞にて視細胞の数を検討したところTail- でも視細胞数の低下を認めたが、Tail+ ではより優位に強い

視細胞数の減少を認め、TUNNELアッセイより、これらの視細胞数の減少は視細胞のアポトーシスによるものであった<sup>7)</sup>。またこの視細胞数の減少は光感受性であり、ACの視細胞での活性化は視細胞死につながると考えられた。

さらに、下流のメカニズムの検討も行った。ACの活性化によりcAMPの濃度が上昇すると考えられるが、cAMPの上昇は神経保護的に働くという報告が多い。このため、cAMPが通常のセカンドメッセンジャーとして下流の分子群を活性化するのか、あるいは視細胞特異的な機能としてcAMPがcGMPのアナログとして作用し、cGMP依存性チャンネルが閉鎖することができず、そのためにカルシウム流入などが生じ視細胞死が起きるのか二つの可能性を検討した。まず、cGMPのアナログとしての検討であるが、cAMPの細胞膜透過性アナログ8-Bromo-cAMPの投与により、*ovl* だけでなく、野生型視細胞においても視細胞死を導入することができた<sup>7)</sup>。しかし、同様のcGMPアナログ8-Bromo-cGMPによっては視細胞死を導入することができず、AC活性化の結果としての視細胞死はcAMP特異的であると考えられた。次に通常のcAMPのターゲットであるPKAの阻害剤により *ovl* の視細胞死は抑制されること、さらにPKAの代表的なターゲットであるCREBのリン酸化が *ovl* において認められることから、我々はAC-cAMP-PKAのシグナルが視細胞死にかかわっていると考えている<sup>7)</sup>。

以上の結果は *ovl* という変異体を用いた結果である。*ovl* はBBS症候群のモデルとされ、実際にBBS症候群の原因遺伝子はCilia関連の遺伝子に集中しているが、ヒトでのIFT88変異の報告はなくマウスにおいてもIFT88のNull Mutantは胎性致死である。実際にヒトへの外装性があるのか検討の必要があると考え、よりヒト網膜色素変性に近いモデルにおいても検討を行った。ヒトQ344X変異を導入ゼブラフィッシュである。この魚は生後4日目よりRod視細胞優位の視細胞死を示し、ヒト網膜色素変性のモデルとして有用である。ロドプシンのQ344塩基は先に述べたC末端の7つの塩基に含まれる。繰り返しとなるが、この場合ロドプシンの機能には変化がないが、ロドプシンの外節への輸送が阻害されてしまう。このため、*ovl* と同様に視物質は細胞体の膜にも局在するようになるため、同様の視細胞死の

機構が働くことが予想される。

この魚において、上記のシグナルがどう動いているかを検討したところ、Q344Xにおいてもやはり視細胞死は光感受性であること、そして、TDの発現抑制で視細胞死は抑制されるが、PDEの発現抑制では視細胞死は抑制されないこと、ACの阻害剤により、視細胞死が抑制されること<sup>7)</sup>から *ovl*と同様のメカニズムが働いていると予測できる。さらに、マウスでの網膜色素変性モデル rd10 の視細胞死に対して抑制的に作用した<sup>7)</sup>。以上のことより、AC-cAMP-PKAの系はヒト網膜色素変性においても活性化されている系ではないかと我々は考えている。

### 網膜色素変性 - 今後の展望

網膜色素変性については患者における二つの大きな疑問に答える形で研究を進めてきた。発症年齢曲線については家系内の再発、カウンセリングに利用するものだが、これはやはり色素変性が晩発性の疾患であるという特徴に起因する。晩発性であるということは、遺伝子型が病気と決定していても、発症していない時期があるということであり、また、色素変性においてはその発症の初期においては患者QOLが大きく低下しないことも考えれば、発症、進行にかかわる環境要因というものは検討する価値が十分にある。光にかかわる視細胞死のそのことを念頭において行った。光という環境のおおもとを操作することが難しくとも、遺伝子によって支配されるその下流の仕組みを調べることによって、環境介入の糸口をつかむべきであると考えている。今後の展望においては上記のようなことを踏まえ、光感受性の下流のさらなる視細胞死のメカニズムの同定、特に、酸化ストレスとの関連を検討しており、それに対する阻害薬についても企業と合同で検討を行っている。

### 参考文献

1. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet*. 368: 1795-1809, 2006
2. 田辺歌子, 藤木慶子, 早川むつ子, 中島章, 樺沢一之. 日本における網膜色素変性症の経験的危険率. *日本眼科学会雑誌*. 96: 231-236, 1992
3. Tsujikawa M, Wada Y, Sukegawa M, Sawa M, Gomi F, Nishida K, et.al. Age at onset curves of retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 126: 337-340, 2008
4. Berson EL. Light deprivation and retinitis pigmentosa. *Vision Res*. 20: 1179-1184, 1980
5. Hao W1, Wenzel A, Obin MS, Chen CK, Brill E, Krasnoperova NV, Eversole-Cire P, Kleyner Y, Taylor A, Simon MI, Grimm C, Rem CE, Lem J. Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nat Genet*. 32: 254-260, 2002
6. Tsujikawa M, Malicki J. Intraflagellar transport genes are essential for differentiation and survival of vertebrate sensory neurons. *Neuron*. 42, 703-716, 2004
7. Nakao T, Tsujikawa M, Notomi S, Ikeda Y, Nishida K. The role of mislocalized phototransduction in photoreceptor cell death of retinitis pigmentosa. *PLoS One* 7: e32472, 2012
8. Doerre, G, Malicki, J Genetic analysis of photoreceptor in cell development in the zebrafish retina. *Mech. Dev*. 110: 125-138, 2002
9. Tsujikawa M, Malicki J. Genetics of photoreceptor development and function in zebrafish. *Int J Dev Biol*. 48: 925-934, 2004
10. Rosenbaum JL., and Witman GB.. Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 3: 813-825, 2002