

厚生労働科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

「高齢化に伴う失明疾患関連遺伝子多型と
オーダーメイド医療への活用」に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 真島 行彦

平成15(2003)年 4月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告		
「高齢化に伴う失明疾患関連遺伝子多型と オーダーメイド医療への活用」に関する研究	-----	1
真島行彦		
II. 分担研究報告		
1. 安価で効率良いミオシリン遺伝子変異検出システムの構築	---	6-9
真島行彦		
2. 日本人緑内障患者における緑内障遺伝子OPTNのスクリーニング	---	10-13
真島行彦、谷原秀信、堀田裕喜		
3. 既知の緑内障遺伝子変異を検出するDNAアッセイ法の開発	---	14-15
真島行彦		
4. 日本人開放隅角緑内障患者における緑内障感受性遺伝子の検索	---	16-29
真島行彦、谷原秀信、堀田裕喜		
1) ミオシリン (MYOC) プロモーターの多型		(16-17)
2) アンギオテンシンII受容体 (AT1) の多型		(18-21)
3) 血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (NOS3) の多型		(22-23)
4) p53 (PT53) の多型		(24-25)
5) SOD2の多型		(26-27)
6) 網膜特異的アミノキシダーゼ (AOC2) プロモーターの多型		(28-29)
5. 正常眼圧緑内障における最高眼圧の違いによる視野・乳頭形態の比較	---	30-31
真島行彦		
6. 正常眼圧緑内障患者の大学病院への受診機転	---	32-33
真島行彦		
7. 緑内障様乳頭陥凹を示すレーベル病萎縮期と正常眼圧緑内障 における視神経乳頭の比較	---	34-35
真島行彦		
8. Invader法を用いたミトコンドリアDNAのヘテロプラスミー定量法の開発	---	36-38
工藤 純		
9. 正常眼圧緑内障における緑内障遺伝子ミオシリン変異	---	39-41
岩田 岳		
10. ミオシリン生体結合タンパク質の同定・解析	---	41-44
岩田 岳		
11. 緑内障危険因子 ―家族性アミロイドーシスとの関連―	---	45-46
谷原秀信		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	48-

高齢化に伴う失明疾患関連遺伝子多型とオーダーメイド医療への活用

主任研究者 真島 行彦 慶應義塾大学医学部 助教授

研究要旨：緑内障は失明原因の第2位であり、有病率は加齢と共に上がり40歳以上では4%で推定約200万人以上存在するが、実際に眼科で治療されているのは2%にすぎないとされている。高齢化社会を迎える日本において、患者の視野・視機能の維持のために、より早期の診断、予防、および緑内障の根本的治療が期待されている。緑内障患者の約30%は優性遺伝の可能性があり、緑内障は多遺伝子疾患である。緑内障遺伝子変異解析システムや検出アッセイ法を構築したので、今後は安価で大量の検体を処理可能である。今年度、明らかな緑内障発症・進行危険因子は同定できていないので、今後も候補遺伝子を探索して行く。緑内障遺伝子ミオシリンの発現系を構築し、ミオシリン結合蛋白を同定するシステムを開発した。正常眼圧緑内障の多くは人間ドック等偶然の検査で疑われた症例であり、今後は早期発見への啓蒙活動の重要性が認識された。

A. 研究目的

加齢に伴う後天性疾患の失明原因の1つとして緑内障がある。緑内障は失明原因の第2位であり、有病率は加齢と共に上がり40歳以上では4%で推定約200万人以上存在するが、実際に眼科で治療されているのは2%にすぎないとされている。緑内障の初期は自覚症状が乏しいため、偶然の眼底検査や人間ドックや健康診断の眼底写真により疑われることも多い。また、一方では自覚症状が乏しいため、視野欠損がかなり進行してから眼科を受診すること患者も多い。高齢化社会を迎える日本において、患者の視野・視機能の維持のために、より早期の診断、予防、および緑内障の根本的治療が期待されている。緑内障の約30%に家族歴があり、緑内障遺伝子変異を検出することは、発症を予測する上で有益な情報となる。一方、緑内障は多遺伝子疾患であり、生活習慣病と関連してとらえることも可能である。いくつかの緑内障感受性遺伝子多型または変異の存在により緑内障の発症および進行に関与する。既知の高血圧、虚血性心疾患や糖尿病等血管病に関連する種々の遺伝子多型に注目し、大規模 Case-control study を行い日本人緑内障患者における危険因子（遺伝子多型）を明らかにすることで、新たな予防法の開発が期待できる。そのために、これら種々の遺伝子変異または多型を安価で簡単に検出できる診断用の DNA チップを今後3年間に開発し、その後の臨床

応用に発展させる。1997年に我々は緑内障遺伝子ミオシリンをクローニングしたが、ミオシリン変異により眼圧が上昇する機序はいまだ不明である。ポスト・ゲノムシーケンスプロジェクトの観点から、ミオシリンの生体結合蛋白の解明とミオシリンとの分子間相互作用を明らかにすることは、眼圧上昇の機序解明に重要であり、ミオシリン結合蛋白を明らかにすることで、将来的に新しい緑内障治療薬の開発につながる可能性がある。

B. 研究方法

1) 緑内障遺伝子変異解析システムの構築と遺伝子解析

日本人特有の遺伝子変異を明らかに、データベース化するには多量の検体を効率よく、しかも安価に行えるシステムの構築が必要である。我々はdenaturing high performance liquid chromatography (DFPLC) を利用した、WAVE® 核酸フラグメント解析システム (TRANSGENOMIC社) に注目した。本装置は全自動で解析を行う。

一方、日本人特有の遺伝子変異情報が蓄積されれば、それらを一気に検出できるDNAチップまたは変異アッセイ法の開発が将来必要となる。我々は、その手段として、Third Wave Technologies社（日本ではビーエムエル社）のInvader法に注目し、共同研究にてアッセイ法を開発した。

2) 緑内障発症・進行危険因子の同定

①レニン・アンギオテンシン系ではアンギオテンシンII受容体(AT1)多型、②攣縮血管に一酸化窒素(NO)分泌低下が明らかにされ、NOによる血管トーン調整という観点から、血管内皮型一酸化窒素合成酵素(NOS3)多型、③緑内障性視神経障害ではアポトーシスによる網膜神経節細胞の障害が提唱されている。アポトーシスを生じる最初の反応の1つにp53の活性化がある。PT53多型、④Manganese Superoxide dismutase(SOD2)はミトコンドリアにおける活性酸素を消去する機能を持つ。従って、その機能低下は活性酸素によるアポトーシスを来し組織障害を生じることが考えられる。SOD2多型。⑤ミオシリンプロモーターに存在する5つの多型。

これらの多型に関して、緑内障との関連を、Case-control studyにより検討した。対象は、正常対照141例、NTG174例、POAG102例である。下記に示す日本の他の共同研究分担者を中心に検体を収集した。

遺伝子解析症例数

施設	正常対照	開放隅角緑内障	正常眼圧緑内障	合計
慶應義塾大学	132	44	117	293
出田眼科	9	31	22	62
順天堂大学	0	14	24	38
浜松医科大学	0	7	9	16
熊本大学	0	6	2	8
合計	141	102	174	417人

⑥ミトコンドリア蛋白の異常が見られるレベル病では高頻度に視神経陥凹がみられることから、正常眼圧緑内障患者において変異ミトコンドリアDNA(mtDNA)ヘテロプラスミーと関連が推測される。ヘテロプラスミーを臨床検査にて簡便かつ精密に計測する方法として、我々はInvader法に注目した。

⑦家族性アミロイドーシスの続発緑内障について、retrospectiveに検討した。緑内障発症年齢は平均 53.1 ± 7.9 歳、全身症状発症から緑内障発症まで 7.01 ± 3.25 歳、瞳孔へのアミロイド沈着から緑内障発症まで 2.55 ± 1.43 年であった。

3) ミオシリンの結合生体蛋白の同定と解析 ミオシリンcDNAをpMIB昆虫発現用ベク

ターに挿入して昆虫細胞に導入・発現し培養液を回収して、これを透析・濃縮・ゲルろ過によって精製を行った。精製ミオシリンは水晶発振子上に固定され、反応チャンパー内で安定した後に、細胞内局在が同一であると考えられているコラーゲンタイプ4やファイブロネクチン等とのタンパク質間相互作用を測定した。

4) 正常眼圧緑内障患者の早期発見に向けて慶應義塾大学病院眼科を初診した正常眼圧緑内障患者の受診機転、視神経障害の状態をカルテからレトロスペクティブに検討した。

遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNAを抽出した。

C. 研究結果

1) 緑内障遺伝子変異解析システムの構築と遺伝子解析

安価で効率の良い遺伝子変異検出システムとして、PCR産物をdenaturing high performance liquid chromatography法で解析するWAVE®核酸フラグメント解析システムを用いることにより、迅速にかつ大量に検体をスクリーニングできるシステムを構築した。対象となる緑内障遺伝子は、ミオシリン、オプチニューリン、そしてチトクロームP4501B1の3つである。現在、緑内障遺伝子ミオシリンに関しては、プレートPCR法で一度に大量のエキソン領域を同一の温度で増幅し、そのままWAVE®核酸フラグメント解析を行うことで検査時間の短縮が可能である。また、ミオシリン変異は4%と頻度が低いので、3検体づつまとめて解析すれば1/3の時間でスクリーニングが可能であり、本システムは検体サンプル量は1/3になっても検出可能であった。

安価で簡単に行える既知の緑内障遺伝子変異を検出するためのアッセイ法を開発した。日本人患者で報告されたMYOCおよびCYP11B1遺伝子変異に関してInvader法にて検出する方法を採用した。64度で2時間から4時間反応させ、蛍光強度を計測することで変異の存在が確認される。

2) 緑内障発症・進行危険因子の同定

- ① AT1多型：A1166C変異(3' untranslated region)とC⁻⁵²¹→T変異は、PCR-RFLP法にて解析した。その結果、A1166C変異に関しては正常対照とPOAG患者およびNTG患者とで関連はなかったが、C⁻⁵²¹→T変異に関しては有意差がみられた
- ② NOS3多型：Glu298Asp変異は、PCR-RFLP法にて解析した。対象は、正常対照141例、NTG146例、POAG103例である。その結果、Glu298Asp変異に関してはgenotype frequency、allele frequencyともに正常対照とPOAG患者およびNTG患者とで関連はなかった。
- ③ PT53多型：Arg72Pro変異は、PCR-RFLP法にて解析した。その結果、Arg72Pro変異に関してはgenotype frequency、allele frequencyともに正常対照とPOAG患者およびNTG患者とで関連はなかった。
- ④ SOD2多型：Val16Ala変異は、PCR-RFLP法にて解析した。その結果、Val-16-Ala変異に関してgenotype frequency、allele frequencyともに正常対照とPOAG患者およびNTG患者とで関連はなかった。
- ⑤ ミオシリンプロモーターの多型：-190Gは多型なし、-153Tは有意差なし、-126Gは多型なし、-83Gは有意差がなかった。-224Cは有意差がみられた。すなわち、CCを持つ患者はそれ以外の患者よりも緑内障発症の危険が高かった (p=0.02)。

⑥ ミトコンドリア機能異常が視神経陥凹と関連することが想定されるので、レベル病ミトコンドリアDNA変異のヘテロプラスミーを安価で簡便に定量できるInvader法を用いたシステムを構築した。Invader法は2色の蛍光標識を用いて、同時に野生型と変異型1塩基置換を検出する方法である。Invader法によりミトコンドリアDNAヘテロプラスミーの定量が可能となった。

⑦ 家族性アミロイドーシスによる緑内障は24%の発症頻度であり、硝子体混濁やとくに瞳孔へのアミロイド沈着を見た場合緑内障の発症の危険性が高い。

3) ミオシリンの結合生体蛋白の同定と解析

ミオシリンの発現方法を改良して水溶性の無分解発現系の開発に成功した。世界で初めて水晶発振子を眼研究に応用してミオシリンの生体機能で重要なタンパク質間相互作用の解析を行った。細胞内局在が同一であると考えられているコラーゲンタイプ4やファイブロネクチン等とのタンパク質間相互作用を測定した。今後は共同研究にてミオシリンの大量発現系を開発し、ミオシリン結合蛋白を同定する。ミオシリン結合蛋白が明らかになれば、ミオシリンの機能の制御が可能となり、臨床的には眼圧の調節につながるので、得られたデータを元に新しい緑内障治療薬の分子創薬につなげる。

4) 正常眼圧緑内障患者の臨床的特徴

慶應義塾大学病院を受診した正常眼圧緑内障の多くは人間ドック等偶然の検査で疑われた症例であった。また、眼圧の日内変動を測定した患者で最高眼圧を16mmHgで2つの群に分けた場合、16mmHg以上の患者の方が、より視野障害が強かったことから、進行因子

に眼圧の関与が考えられた。従って、正常眼圧緑内障を治療する場合、最高眼圧の違いにより病因、進行因子が異なる可能性があり、これらを今後遺伝子レベルで明らかにする必要がある。今後は、早期発見への啓蒙活動の重要性が認識された。

D. 考察

1) 緑内障遺伝子変異解析システムの構築と遺伝子解析

WAVE®核酸フラグメント解析システムを用いた緑内障遺伝子変異をスクリーニングするシステムを構築したので、日本の幾つかの施設と共同で検体サンプルを解析し、日本人患者における分子疫学的検討を行い、今後のデータベース構築に利用する。今後2年間で500検体の解析を予定している。

既知の緑内障遺伝子変異を検出するためのアッセイ法としてInvader法を採用した。ビーエムエル社は昨年スライドガラス大のチップ上に5040個のwellを集積させた方法を開発した。これを使用すれば、1well当たり1ngの試料からでも判定が可能なので、将来臨床応用の可能性があると考えられる。

2) 緑内障発症・進行危険因子の同定

緑内障の発症、進行に関連する感受性遺伝子多型は未だに明らかでないので、今後も種々の候補遺伝子を解析する必要がある。しかし、効率が悪いので、この点を踏まえ、来年度は網羅的なゲノムスキャンによる緑内障関連遺伝子検索を全染色体を対象に検索する方法を行う。

Invader法によりミトコンドリアDNAヘテロプラスミーの定量が可能となった。今後は緑内障患者多数例において、レーベル病と関連のあるミトコンドリアDNAの6つのSNPs、すなわちG3460A変異、G11778A変異、T14484C変異、T9101C変異、G9804A変異、C14498T変異を検討

する。それらとの関連が明らかになれば緑内障発症と加齢との関係が想定される。

3) ミオシリンの結合生体蛋白の同定と解析

ミオシリンの発現方法を改良して水溶性の無分解発現系の開発に成功したが、十分な量のミオシリンを得るための精製法にはまだ改良の余地がある。今後は共同研究にてミオシリンの大量発現系を開発し、ミオシリン結合蛋白を同定する。ミオシリン結合蛋白が明らかになれば、ミオシリンの機能の制御が可能となり、臨床的には眼圧の調節につながるので、得られたデータを元に新しい緑内障治療薬の分子創薬につなげる。

4) 正常眼圧緑内障患者の臨床的特徴

正常眼圧緑内障を治療する場合、最高眼圧の違いにより病因、進行因子が異なる可能性があり、これらを今後遺伝子レベルで明らかにする必要がある。正常眼圧緑内障の多くは人間ドック等偶然の検査で疑われた症例であり、今後は早期発見への啓蒙活動の重要性が認識された。

E. 結論

今年度は、次年度の研究発展のための下地がほぼ完成した。すなわち、緑内障遺伝子変異解析システムを構築したので、今後は大量の検体を処理可能である。共同研究施設を通じて、多くの検体が全国から集まりつつある。緑内障発症・進行危険因子の同定には今後も種々の遺伝子に注目する。来年度は網羅的なゲノムスキャンによる緑内障関連遺伝子検索を全染色体を対象に検索する方法を行う。将来、新たな緑内障治療薬の開発につながるミオシリン結合蛋白を同定する方法も確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

真島行彦：緑内障の原因遺伝子解明戦略. 眼科紀要 53;753-756, 2002

高橋弘毅、大竹雄一郎、窪田 良、木村 至、宮田 博、宮田和典、谷野富彦、真島行彦：ミオシリン遺伝子変異を持つ家族性原発開放隅角緑内障の2家系. 日眼会誌 106;201-207, 2002

木村章, 家族性アミロイドーシス 眼科, 44, 1670-1673, 2002

真島行彦：先天緑内障と遺伝子変異. 日本眼科臨床医報 97;113-116, 2003

石川果林、谷野富彦、大竹雄一郎、木村 至、宮田 博、真島行彦：正常眼圧緑内障における最高眼圧の違いによる視野・乳頭形態の比較. 日眼会誌 107, 2003 印刷中

Mashima Y, Kimura I, Yamamoto Y, Ohde H, Ohtake Y, Tanino T, Tomita G, Oguchi Y: Optic disc excavation in an atrophic stage of Leber's hereditary optic neuropathy: differentiation from normal-tension glaucoma. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 241:75-80, 2003

Ohtake Y, Tanino T, Suzuki Y, Miyata H, Taomoto M, Azuma N, Tanihara H, Araie M, Mashima Y.: Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (CYP1B1) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. Br J Ophthalmol 87:302-304. 2003

Kimura A, Ando E, Fukushima M, Koga T, Hirata A, Arimura K, Ando Y, Negi A, Tanihara H.: Secondary Glaucoma in patients with familial amyloidotic polyneuropathy. Arch Ophthalmol 121:351-356, 2003

2. 学会発表

木村 至、谷野富彦、大竹雄一郎、真島行彦：正常眼圧緑内障患者におけるエンドセリン-1の血漿濃度の検討 第106回日本眼科学会総会 平成15年5月(仙台市)

泉香奈子、真島行彦、大竹雄一郎、谷野富彦、宮田 博、田中靖彦、岩田 岳：正常眼圧緑内障における緑内障遺伝子ミオシリン変異 第13回日本緑内障学会 平成15年9月20日(横浜)

佐藤裕理、谷野富彦、大竹雄一郎、真島行彦、宮田 博：慶應義塾大学病院における正常眼圧緑内障受診患者の機転 第13回日本緑内障学会 平成14年9月20日(横浜)

有村和枝、木村章、古賀貴久、米村昌宏、安東えい子、谷原秀信：家族性アミロイドーシスにおける続発緑内障についての検討 第13回日本緑内障学会 平成14年9月20日(横浜)

T. Iwata, M. Obazawa, Y. Mashima, S. Noda, J. Kudoh, N. Shimizu, Y. Tanaka. Cloning, Expression and Characterization of Porcine Myocilin. XV International Congress of Eye Research, October 2002 (Geneva, Switzerland)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究協力者

谷野 富彦	慶應義塾大学医学部
大竹 雄一郎	慶應義塾大学医学部
船山 智代	慶應義塾大学医学部
橋爪 公平	慶應義塾大学医学部
張 強	慶應義塾大学医学部
泉 香奈子	慶應義塾大学医学部
石川 果林	慶應義塾大学医学部
佐藤 裕理	慶應義塾大学医学部

安価で効率良いミオシリン遺伝子変異検出システムの構築

主任研究者 真島行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
研究協力者 船山智代 慶應義塾大学医学部

研究要旨：開放隅角緑内障患者の約4%（本邦で推定6万人）はミオシリン遺伝子異常により発症することが考えられる。緑内障発症の危険因子を明らかにすることは、早期発見、早期治療に有用である。我々は、ミオシリン遺伝子に関して、プレートPCR法で一度に大量のエキソン領域を同一の温度で増幅し、そのまま、プレートをdenaturing high performance liquid chromatography法で解析するWAVE®核酸フラグメント解析システムを用いることにより、安価で迅速にかつ大量に検体をスクリーニングできるシステムを構築した。

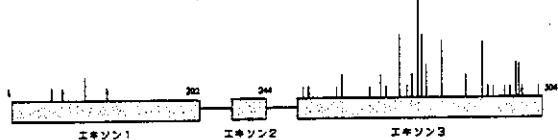
A. 研究目的

若年発症の開放隅角緑内障患者（JPOAG）では8-36%、成人発症患者では3-5%にミオシリン変異を有する（Wiggs JL, et al. Am J Hum Genet 1998;63:1549; Fingert JH, et al. Hum Mol Genet 1999;8:899; Shimizu S, et al. Am J Ophthalmol 2000;130:165）。家族性および非家族性を含めたPOAG患者全体では約3-5%がミオシリン遺伝子変異をもつことが考えられる（Alward WL, et al. N Engl J Med 1998;338:1022; Fingert JH, et al. Hum Mol Genet 1999;8:899）。日本人のPOAG患者ではミオシリン変異は約3%に認められた（Fingert JH, et al. Hum Mol Genet 1999;8:899; Kubota R, et al. Hum Mutat 2000;16:270. Online Citation: Human Mutation, Mutation in Breif #355）。本邦においては、POAGの有病率は40歳以上では約4%で、推定200万人存在するとされている。従って、ミオシリン変異をもつ患者は少なくとも6万人存在することになる。また、200万人の緑内障患者の内、実際に眼科を受診する患者は20%程度と考えられており、緑内障の早期発見、早期治療が失明患者の減少につながる。

現在まで、ミオシリンの50か所以上のアミノ酸変異が確認されているが、変異はエキソン3のオルファクトメジン様ドメインに集積している（表1）。従って、この領域を効率よく、かつ安価でスクリーニングし、変異を検出するシステムの開発が望まれる。

表1 ミオシリン遺伝子変異の位置と頻度

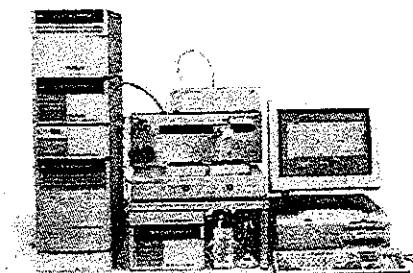
変異	アミノ酸の変化を伴う多型	
エキソン1	4	15
エキソン2	0	3
エキソン3	52	11
	56	29
	(1997-2002年)	



B. 研究方法

遺伝子における塩基の変化を効率よく、かつ安価で検出する器機として、我々はdenaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)を利用した、WAVE®核酸フラグメント解析システム（TRANSGENOMIC社）に注目した。

WAVE®核酸フラグメント解析システム
WAVE®



PCR法の条件とDHPLC法の条件は表2に示す。

表2 ミオシリン遺伝子解析用のPCR用プライマーおよびDHPLCの条件

Exon	primer	増幅長	PCR (Tm)	WAVE (予想Tm)	WAVE (測定Tm)
1A	MYO1F1 AGC ACA GCA GAG CTT TCC AGA GGA MYO1R4 GGT TGC GAA TCT GGA CCT C	307 bp	57 or 60	61.8	60.8 61.8 63.5
1B	MYOC1BF CAG GCC ATG TCA GTC ATC CA MYO1R3 CTG ATT CCG TTC TTT TAC TCT	297 bp	60	61.2	58.1 61.2 62.1 64.5
1C	MYO1F3 GAA ACC CAA ACC AGA GAG MYO1R1 CTG AGA CTC AAG TCG TCC ACT ATA	255 bp	57	61	61 62 64
2A	MYO2F1 CCT CAA CAT AGT CAA TCC TTG GGC MYO2R1 ACG GGT GTA CCA GAA ATA AGT ACA	245 bp	60	56.3	55.3 56.3 57.3 60
3A	MYO3F1 GAT TAT GGA TTA AGT GGT GCT TC MYO3R3 TAC TCG ACT TAT GGC TCT GT	375 bp	60	59.3	59.3 61.3
3B	MYOC3BF CAT ACT GCC TAG GCC ACT GGA MYO3R4 CAT TCG TCA GTC AGC GGT TA	337 bp	57 or 60	60.9	60.9 61.4
3C	MYO3F3 GAA TCT GGA ACT CGA ACA AA MYOC3CR TAC CGT CTT CCT CTA CGA GTC	333 bp	57	59.8	59.8 60.3

PCR 産物のシーケンス反応は、Applied Biosystems 社の BigDye Terminator Ver. 3.0 を使用して、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer にて行った。実際の方法を以下に示す。

- 1) 96 穴プレートを用いて、プレート PCR 法で7カ所のエキソン領域を増幅する。この場合、アニーリング温度は 59 度とした。
- 2) 96 穴プレートをそのまま WAVE®核酸フラグメント解析システムに用いて、各エキソン領域を2つの温度で解析する。
- 3) 変異、多型の存在が疑われたエキソン領域を、自動シーケンサーを用いて、塩基配列を決定する。

遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNA を抽出した。

C. 研究結果

新たに検出された Thr488Pro 変異の結果を示す。図1はエキソン3C領域における61度の解析で、野生型とは波形の異なる2つの検体 (Ala488Ala、Thr448Pro) が検出されている。解析温度 61.7 度ではより波形の変化は顕著である。

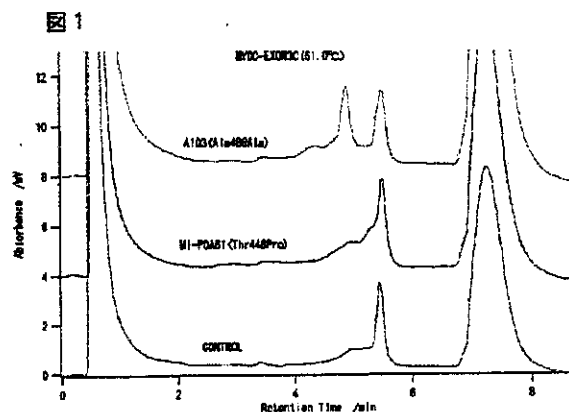


図2は、解析温度の違いによる波形の変化を示す。Aは野生型、Bは変異型(Thr448Pro)を示す。エクソン3C領域では59.8度から62.2度の間では、野生型と変異型の波形が異なるので、解析可能であるが62.2度以上の温度では野生型と変わらない波形になることが考えられる。

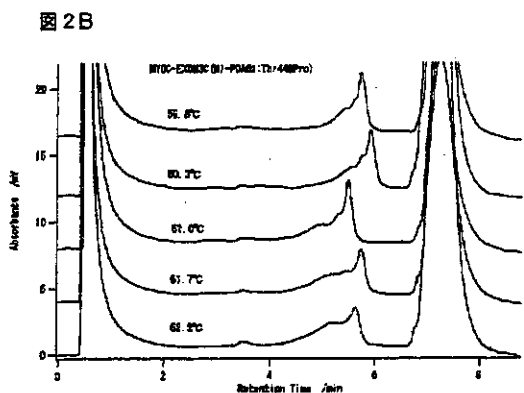
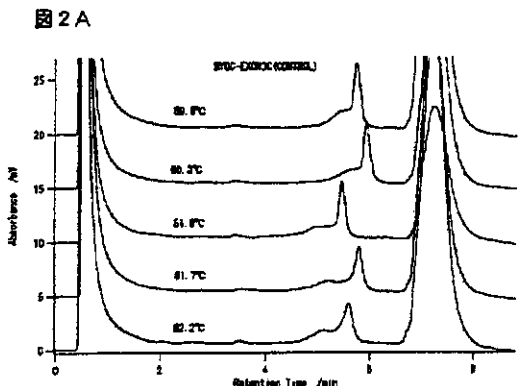


図3に、DHPLCにおいて塩基配列から予測される温度による融解の状態を示す。上段より60度前後でシャープな融解を示す。下段より真ん中の60.8度の融解カーブではほぼ変異が検出されることが予測される。

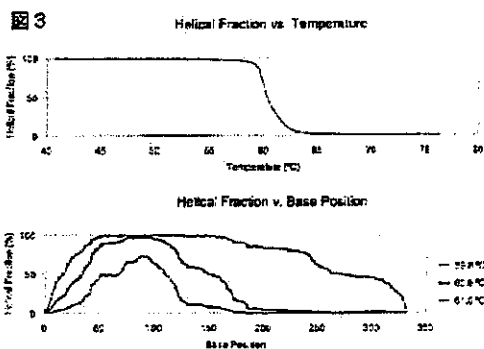
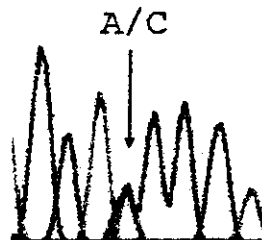
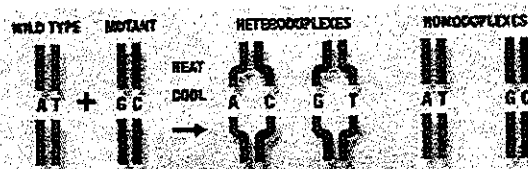


図4に Thr448Pro 変異の塩基配列を示す。スレオニン (AAC) からプロリン (CCC) に変化している。

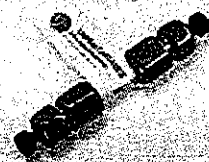


D. 考察

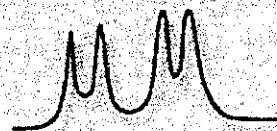
DHPLC 法は温度調整ヘテロ二本鎖解析法で、多型や変異がある DNA と野生型 DNA とをハイブリダイズすると、ヘテロ二本鎖が形成される。ヘテロ二本鎖はホモ二本鎖よりも低い温度で熱変性する性質があるため、WAVE®核酸フラグメント解析システムではこれらを簡単に分離可能である。



Separation under partially denaturing conditions

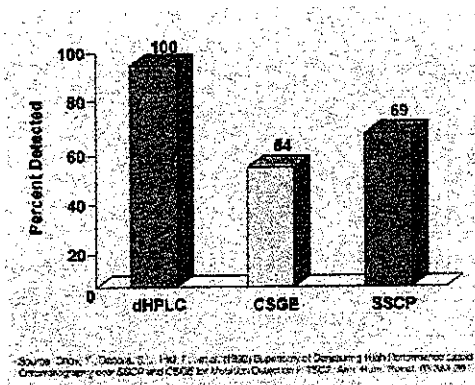


Partially denatured heteroduplexes elute faster than non-denatured homoduplexes



変異検出精度に関しては、DHPLC 法は SSCP 法よりも検出感度が高いことが報告されている (Choy Y, et al. Ann Hum Genet 1999;63:383)。

変異検出精度の比較



1 検体あたりの分析コストは、DHPLC 法では約 63 円、SSCP 法では約 390 円、自動シーケンサーでは約 220 円とされている。WAVE®核酸フラグメント解析システムは、自動で行われるため 1 日約 240 検体の処理が可能である。

眼科疾患領域でも、WAVE®核酸フラグメント解析システムを使用した報告がみられる (Marchant D, et al. Ophthalmic Genet 2002;23:167; Challa P et al. J Glaucoma 2002;11:416; Cobb CJ et al. B J Ophthalmol 2002;86:191)。今回の我々の新たなシステムの特徴は、ミオシリン遺伝子領域を 7カ所に分け、その 7カ所の PCR 反応を 1つの温度で行い一度に増幅する。この場合、96 穴のプレート PCR 法で行う。変異はエキソン 3 のオルファクトメジン様ドメインに集積しているの、この領域だけであれば 3カ所の PCR 反応で良い。この 96 穴のプレートはそのまま、WAVE®核酸フラグメント解析システムに用いることができる。各エキソン領域は最低 2つの温度で解析することで、ほぼ塩基の変異を検出することが可能と思われる。ホモ変異の場合は、本システムでは検出できないが、ミオシリン変異の緑内障は常染色体優性遺伝なので問題はない。ミオシリン変異は POAG 患者の約 4% にしかみられないため、更に 3人分の患者のサンプルを混ぜて行うことにより、より効率良く、安価でかつ迅速 (解析時間が三分の一に短縮) に検出が可能である。

E. 結論

96 穴のプレート PCR 法および WAVE®核酸フラグメント解析システムを行うことにより、短時間で大量の検体をスクリーニングできるシステムを構築した。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

日本人緑内障患者における緑内障遺伝子 Optinurin (OPTN) のスクリーニング

主任研究者 真島行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
 分担研究者 谷原 秀信 熊本大学医学部眼科 教授
 堀田 喜裕 浜松医科大学眼科 教授
 研究協力者 船山 智代 慶應義塾大学医学部

研究要旨：2番目の緑内障遺伝子 OPTN は 2002 年に正常眼圧緑内障の原因遺伝子として報告され、アメリカでは開放隅角緑内障患者の約 10% に変異がみられる。緑内障発症の危険因子を明らかにすることは、早期発見、早期治療に有用である。我々は、日本人緑内障患者の OPTN 遺伝子を denaturing high performance liquid chromatography 法 (WAVE® 核酸フラグメント解析システム) にてスクリーニングした。その結果、明らかな遺伝子変異は現在まで確認されていない。従って、日本人においては OPTN 遺伝子は緑内障の原因遺伝子としては稀と思われた。

A. 研究目的

日本人の開放隅角緑内障の有病率は 40 歳以上では約 4% で、推定 200 万人存在するとされている。その 90% は正常眼圧緑内障である。また、200 万人の緑内障患者の内、実際に眼科を受診する患者は 20% 程度と考えられており、緑内障の早期発見、早期治療が失明患者の減少につながる。

2002 年に、2番目の緑内障遺伝子 OPTN が同定され、アメリカ人において OPTN 遺伝子のアミノ酸変異は 3カ所が報告されている (表 1) (Rezaie T, et al. Science 2002;295:1077)。

表 1

表 1 緑内障遺伝子 Optineuria (OPTN) の変異

Exon		Glaucoma	Normal
4	E50K	7/52(13.5%)	0/540
6	InsAG(Premature stop)	1/46(2.2%)	0/200
16	R545Q	1/46(2.2%)	0/100
危険因子			
5	M98K	23/169(13.6%)	9/422(2.1%)

更に危険因子として 1カ所のアミノ酸変異がある。約 16.7% の患者に OPTN 遺伝子が報告された。また、この遺伝子は GLC1E 座位に

存在する正常眼圧緑内障に関連するとされている (Sarfarazi M, et al. Am J Hum Genet 1998;62:641)。日本人開放隅角緑内障患者の内、正常眼圧緑内障は 90% を占めるので、本遺伝子が日本人患者において頻度の高い原因遺伝子である可能性がある。従って、我々は、日本人緑内障患者の OPTN 遺伝子を denaturing high performance liquid chromatography 法 (WAVE® 核酸フラグメント解析システム) にてスクリーニングし、変異の種類と頻度を明らかにする。

B. 研究方法

対象は正常対照 141 例、NTG172 例、POAG102 例である (表 2)。

表 2

遺伝子解析症例数

施設	正常対照	開放隅角緑内障	正常眼圧緑内障	合計
慶應義塾大学	132	44	117	293
出田眼科	9	31	22	62
順天堂大学	0	14	24	38
浜松医科大学	0	7	9	16
熊本大学	0	6	2	8
合計	141	102	174	417人

遺伝子における塩基の変化を効率よく、かつ安価で検出するシステムとして、我々は denaturing high performance liquid chromatography (DFPLC) を利用した WAVE® 核酸フラグメント解析システム (TRANSGENOMIC 社) に注目した。PCR 法のプライマーを示す。

PCR プライマー配列

[1] OPTN4 317bp (191 bp)
 OPTN4F1 CCAGTGGGTTTGTGGGACTCC
 OPTN4R1 AAAGGGATGGCATTCTCTGCA
 [2] OPTN5 277 bp (203 bp)
 OPTN5F3 GTCCACTTCTCTGGTGTGTGACT
 OPTN5R4 CAACATCACAATGGATCG
 [3] OPTN6 293 bp (183 bp)
 OPTN6F1 AGCCTTAGTTTGTATCTGTTTCATTCA
 OPTN6R2 GTTTCATCTTCCAGGGGAGGCT
 [4] OPTN7 205bp (74 bp)
 OPTN7F3
 CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGTAGACATATTGTGTTAAATCCCT
 OPTN7R2 GTGACAAGCACCCAGTGACGA
 [5] OPTN8 320 bp (153 bp)
 OPTN8F3
 CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGGTTACTCTCTTCTTAGTCTTTGGA
 OPTN8R2 GGGTGAAGTGTATGGTATCTTAATT
 [6] OPTN9 242 bp (103 bp)
 OPTN9F4
 CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGCTATTTCTCTTAAAGCCAAAGAGA
 OPTN9R2 CAGTGGCTGGACTACTCTCGT
 [7] OPTN10 227 bp (116 bp)
 OPTN10F3
 CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGTTCAGATGATAATTGTACAGATAT
 OPTN10R2 AATGTATATTTCAAAGGAGGATAAA
 [8] OPTN11 286 bp (150 bp)
 OPTN11F2 CCACTGCGACGTAAAGGAGCA
 OPTN11R1 CAAATCCGAATTCATCTGTATAA
 [9] OPTN12 233 bp (94 bp)
 OPTN12F3
 CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGGTTGGAGGCAAGACTATAAGTT
 OPTN12R1 TTCTGTTCACTACTAGGCTATGGAA
 [10] OPTN13 264 bp (159 bp)
 OPTN13F3 CAGGCAGAATTATTTCAAACCAT
 OPTN13R1 CGAGAATACAGTCAGGGGCTGG
 [11] OPTN14 260bp (131 bp)
 OPTN14F3 GCACTACCTCCTCATCGCATAAACA
 OPTN14R4 GGCCATGCTGATGTGAGCTCT
 [12] OPTN15 282bp (80 bp)
 OPTN15F3
 CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGGACTGTCTGCTCAGTGTGTGCA
 OPTN15R1 GGTGCCTTGATTGGAATCCA

[13] OPTN16 294 bp (172 bp)
 OPTN16F4
 CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGCACAACCTGCCTGCAAAAATGGAAC
 T
 OPTN16R4 GAGGCAAAAATATTTGAGTGAAAACA

スクリーニングの方法は、

- 1) PCR 法で13カ所のエクソン領域を増幅する。
- 2) WAVE®核酸フラグメント解析システムに用いて、各エクソン領域を2つの温度で解析する。
- 3) OPTN 変異の頻度が低い事が幾つか報告されているので、エクソン4, 5, 16以外は3検体ずつまとめて検査した。
- 4) 変異、多型の存在が疑われたエクソン領域を、自動シーケンサーを用いて、塩基配列を決定する。

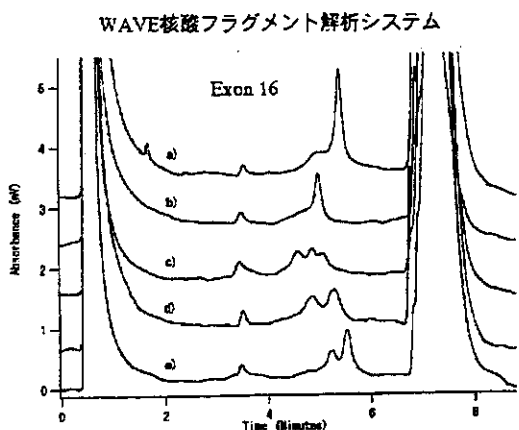
遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNA を抽出した。

C. 研究結果

現在まで、13個のエクソン領域の内、エクソン4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16の8カ所の解析が終了した。結果を表3に示す。疾患の原因となる遺伝子変異は同定されなかった。アミノ酸の変化を伴う変異は、正常人と急性閉塞隅角緑内障患者にみられた。

WAVE®核酸フラグメント解析システムによるエクソン16の解析結果を図1に示す。1列目は正常で、以下4種類の塩基置換が検出されている。1塩基置換の検出感度は高いことが示唆された。

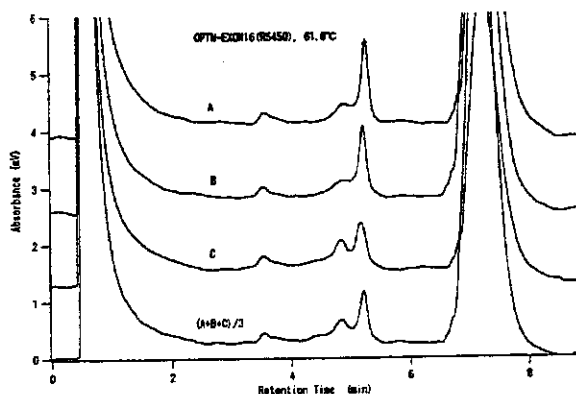
図 1



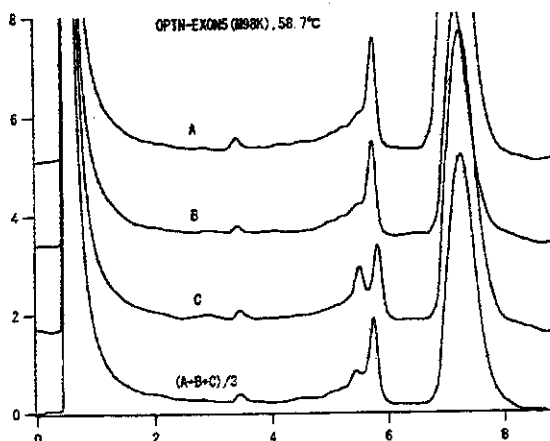
3 検体分を混合しても、変異の検出は可能であった。従って、1/3の早さでスクリーニングが可能であった。その結果を図2に示す。1列目は正常、2列目は正常、3列目は変異を持つ症例を示し、4列目は3検体を混合した解析結果である

図 2

R545Q 変異



M98K 変異



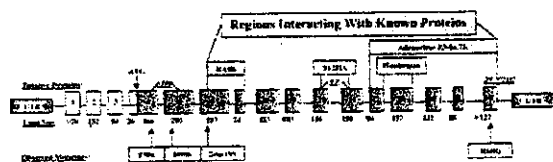
D. 考察

DHPLC 法は温度調整ヘテロ二本鎖解析法で、多型や変異がある DNA と野生型 DNA とをハイブリダイズすると、ヘテロ二本鎖が形成される。ヘテロ二本鎖はホモ二本鎖よりも低い温度で熱変性する性質があるため、WAVE®核磁フラグメント解析システムではこれらを簡単に分離可能である。変異検出精度に関しては、DHPLC 法は SSCP 法よりも検出感度が高いことが報告されている (Choy Y, et al. Ann Hum Genet 1999;63:383)。1 検体あたりの分析コストは、DHPLC 法では約 63 円、SSCP 法では約 390 円、自動シーケンサーでは約 220 円とされている。WAVE®核磁フラグメント解析システムは、自動で行われるため 1 日約 240 検体の処理が可能である。

2 番目の緑内障遺伝子 *OPTN* は、10 番染色体の GLC1E 座位 (10p15-p14) に存在する (Rezaie T, et al. Science 2002;295:1077)。遺伝子構造を図 3 に示す。*OPTN* と結合する蛋白は現在 4 種類明らかになっている。機能は明らかではないが、神経保護に関連するとされている。

図 3

Optineurin 遺伝子



3 種類の変異が 54 家系中 9 家系、16.7% にみつかった。また、M98K 多型は正常人 (2.1%) に比べ、有意に緑内障患者 (13.6%) に多くみられ、危険因子とされた。しかしながら、その後緑内障患者における *OPTN* 遺伝子変異は、アメリカ人や日本人患者でも検討されているが、Rezaie T らが報告した変異以外見つかっていない。今回の検査では、少なくとも M98K 多型は正常

人と緑内障患者で差はなかった。

E. 結論

日本人においても *OPTN* 遺伝子は緑内障の原因遺伝子としては稀と思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表3 *OPTN* 遺伝子の変化

Exon	cDNA change	Predicted protein change	Amino acid change
4	c. 386C→G	His 26 Asp	
4	c. 449C,450T,451C deletion	Leu 47 deletion	
4	c. 412G→A		Thr 34 Thr
5	c. 531C→T	Ala 74 Val	
5	c. 603T→A	Met 98 Lys	
16	c. 1944G→A	Arg 545 Glu	
16	c. 2023C→T		His 571 His

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

既知の緑内障遺伝子変異を検出する DNA アッセイ法の開発

主任研究者 真島行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
研究協力者 船山智代 慶應義塾大学医学部
株式会社 ビーエムエル社

研究要旨：緑内障遺伝子であるミオシリン (MYOC)、オプチニューリン (OPTN)、チトクローム P450 1B1 (CYP1B1) において、日本人患者で報告された変異を簡単に検出する方法として、Invader 法を用いる方法を開発した。

A. 研究目的

開放隅角緑内障 (POAG) の有病率は 40 歳以上では約 4% で、推定 200 万人存在するとされている。従って、ミオシリン変異をもつ患者は少なくとも 6 万人存在することになる。現在まで日本人患者のミオシリン変異は 5 種類報告されている。また、200 万人の緑内障患者の内、実際に眼科を受診する患者は 20% 程度と考えられており、緑内障の早期発見、早期治療が失明患者の減少につながる。一方、先天緑内障は日本人においてはその発症頻度は不明であるが、約 20% にチトクローム P450 1B1 遺伝子 (CYP1B1) 変異が報告された (Mashima, et al. IOVS 2001;42:2211)。先天緑内障は家族性の場合には常染色体劣性である。従って、CYP1B1 変異の種類はある程度限られており、現在まで日本人患者の変異は 13 種類程度である。我々は、簡単にこれらの DNA 変異をスクリーニングする方法として、Invader 法を応用して開発した。Invader 法は PCR 法に依存しない検査法である。

B. 研究方法

Invader 法は PCR 法を使用せず、1 塩基置換を検出できる方法である。Invader 法は、2 セットの特異的なシグナルプローブ、インバーダーオリゴ、FRET プローブと 2 色の蛍光標識を用いて、同時に野生型と変異型 1 塩基置換を検出する方法である。

Invader によるアッセイ法は、Third Wave Technologies 社から提供された 96-well プレートを用いた。各 well には Cleavase® enzyme XIII, FRET probe, MOPS buffer, および

polyethylene glycol が乾燥された状態で予め入っている。アッセイには、wild primary probe、mutant primary probe および Invader® oligonucleotide を入れ、64 度で 2 時間から 4 時間反応させ、蛍光強度を計測する (CytoFlour 4000)。

Invader法の原理 2

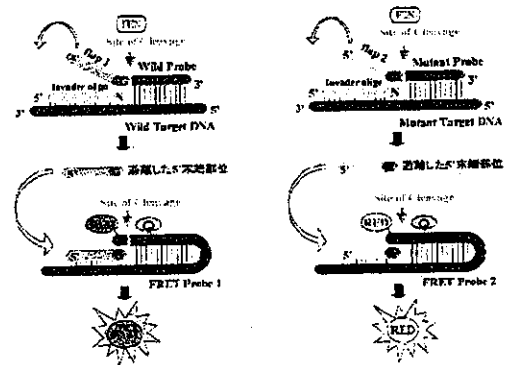


表 1 に今回作成した検出する遺伝子変異を記載した。MYOC 変異の SNPs 4 カ所、OPTN 変異の SNP 1 カ所および CYP1B1 変異の SNPs 13 カ所である。赤字はコントロール DNA により Invader 法により検出が確認された SNPs である。

遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNA を抽出した。

表1 検出SNPs

No.	Mutation	No.	Mutation
1	MYOC Thr353Ile	1	CYP1B1 C3130T
2	MYOC Gly367Arg	2	CYP1B1 3964 del C
3	MYOC Pro370Leu	3	CYP1B1 Asp192Val
4	MYOC Thr448Pro	4	CYP1B1 Val198Ile
		5	CYP1B1 Cys280stop
1	OPTN Arg545Glu	6	CYP1B1 Val320Leu
		7	CYP1B1 4776 ins AT
		8	CYP1B1 Ala330Phe
		9	CYP1B1 Val364Met
		10	CYP1B1 Arg390Cys
		11	CYP1B1 1620 G ins
		12	CYP1B1 Arg444Gln
		13	CYP1B1 Glu499Gly

C. 研究結果

96-well プレートの各 well に各々の変異検出のプローブを固定し、64度という同一の温度で一度に全部アッセイすることが可能であった。

D. 考察

通常の DNA チップ法は PCR 法で目的の遺伝子領域を増幅するが、PCR 法+DNA チップ法の測定精度は約 90%とされているが、本法は 99.7%の測定精度をもつ。さらに Invader 法は迅速かつ容易に検出が可能である。今後は、まず、このアッセイ法を用いて CYP1B1 変異の保因者がスクリーニングできるか検討したい。

E. 結論

Invader 法は、既知の遺伝子変異を多数症例において簡便にかつ短時間にスクリーニング出来る方法と思われる。ビーエムエル社は昨年スライドガラス大のチップ上に 5040 個の well を集積させた方法を開発した。これを使用すれば、1 well 当たり 1 ng の試料からでも判定が可能なので、将来臨床応用の可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

日本人開放隅角緑内障患者における緑内障感受性遺伝子の検索
—ミオシリンプロモーターの多型（preliminary study）—

主任研究者 真島行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
研究協力者 株式会社 三菱ビーシーエル

研究要旨：緑内障遺伝子ミオシリンは、主に常染色体優性遺伝性の若年発症の開放隅角緑内障の疾患遺伝子であるが、成人発症の開放隅角緑内障患者にも遺伝子変異がみられる。ミオシリンは緑内障遺伝子として約3%の開放隅角緑内障患者に変異がみられる。今回、欧米で報告された5カ所のミオシリンプロモーターの多型と緑内障との関連を、Case-control studyにより検討し、ミオシリン多型が緑内障発症の危険因子か否かを検討した。-190Gは多型なし、-153Tは有意差なし、-126Gは多型なし、-83Gは有意差がなかった。-224Cは有意差がみられた。すなわち、CCを持つ患者はそれ以外の患者よりも緑内障発症の危険が高かった（ $p=0.02$ ）。

A. 研究目的

緑内障は多因子（多遺伝子）疾患であり、その発症には加齢、環境因子、遺伝的素因等いろいろな因子が関与している。現在、緑内障発症の危険因子として、高眼圧、加齢、人種、家族歴、近視、糖尿病、心血管障害が考えられている。ミオシリンは緑内障遺伝子として、早期発症の緑内障患者では8-36%、成人発症患者では3-5%にミオシリン変異を有する。家族性および非家族性を含めたPOAG患者全体では約3-5%がミオシリン遺伝子変異をもつことが考えられる。今回は、これまでに欧米で報告された5カ所のミオシリンプロモーターの多型（Fingert JH, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:145-52）と緑内障との関連を、Case-control studyにより検討し、ミオシリン多型が緑内障発症の危険因子か否かを検討した。

B. 研究方法

ミオシリンプロモーター領域をPCR法で増幅し、塩基配列を決定した。注目したSNPsは、-224C、-190G、-153T、-126G、-83Gの5カ所である。正常対照は100人、POAGは101人であった。

塩基配列決定法に用いたPCRプライマーは、Myo P5: TGT GTG TGT GTG TGT AAA ACC ACGとMyo P4: CTG GAA AGC TGT GCT GTG Cである。PCR法の条件は、1) 94°C 5分、2) 94°C

30秒、57°C 30秒、72°C 30秒を35サイクル、3) 72°C 5分、そして4) 4°Cにして終了した。直接塩基配列決定は、増幅されたPCR産物をBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems)を使用して反応を行った。反応生成物を精製し、ABI PRISM 3100を用いて塩基配列の解析を行った。

遺伝子解析に関しては倫理委員会の承認を得た。緑内障患者からの血液検体は、本研究の目的、研究対象者に対する人権保護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、理解を求めた。その後、患者の同意を得て同意書にサインした後血液を採取し、DNAを抽出した。

C. 研究結果

-190Gは多型なし、-153Tは有意差なし、-126Gは多型なし、-83Gは有意差がなかった。-224Cは有意差がみられた。以下にその結果を示す。解析方法はカイ自乗検定法である。5%以下を有意差ありとした。

Genotype frequency			
	C/C	C/T	T/T
	(%)	(%)	(%)
正常対照	36	54	10
(N=100)	(36)	(54)	(10)
POAG	53	35	13
(N=101)	(52.5)	(34.6)	(12.9)

Genotype frequency				
	C/C	C/T+T/T	p	オッズ比
	(%)	(%)		
正常対照	36	64		
(N=100)	(36)	(64)		
POAG	53	48	0.02	0.509
(N=101)	(52.5)	(47.5)		

x 2

Genotype frequency				
	C/C+C/T	T/T	p	オッズ比
	(%)	(%)		
正常対照	90	10		
(N=100)	(90)	(10)		
POAG	88	13	0.409	1.329
(N=101)	(87.1)	(12.9)		

x 2

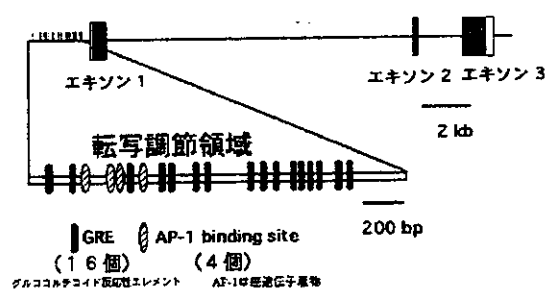
Allele frequency				
	C	T	p	オッズ比
	(%)	(%)		
正常対照	126	74		
(N=100)	(63)	(37)		
POAG	141	61	0.149	0.74
(N=101)	(69.8)	(30.2)		

x 2

D. 考察

ミオシリンは、多くの眼組織に発現がみられるが、特に線維柱帯細胞に強い発現がみられる。In vitro では、線維柱帯細胞をステロイド剤とともに培養すると、ミオシリンの発現量が増加する。転写調節領域には様々な調節因子の結合部位が存在している。その中で特徴的なものはグルココルチコイド反応性エレメント (GRE)、AP-1 結合部位、筋肉の分化誘導に関係している myogenin 結合部位、2 塩基 (GT) 繰り返し配列などである。

ミオシリン遺伝子の構造



ミオシリンは酸化や紫外線によるストレス等の様々な刺激によって誘導されることが明らかとなっている。このような刺激に線維柱帯細胞のミオシリンが反応し、緑内障を引き起こしている可能性がある。つまり、加齢による様々なストレスの蓄積がミオシリンの発現を誘導し、遺伝性の緑内障以外の一般的な緑内障においても、緑内障が発症するのではないかという仮説である。従って、プロモーター部分の異常も蛋白質のコーディング領域の異常と同じように、病気を発症させる可能性は十分考えられる。

E. 結論

今後は Invader 法により、-224C 多型を多数症例で検討する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

日本人開放隅角緑内障患者における緑内障感受性遺伝子の検索
—アンジオテンシン II 受容体 (AT1) の多型—

主任研究者 真島 行彦 慶應義塾大学医学部 助教授
分担研究者 谷原 秀信 熊本大学医学部眼科 教授
堀田 喜裕 浜松医科大学眼科 教授
研究協力者 橋爪 公平 慶應義塾大学医学部

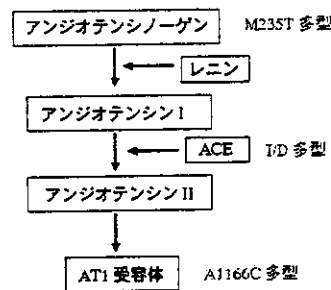
研究要旨：レニン・アンジオテンシン系のアンジオテンシン II 受容体 (AT1) の多型と緑内障との関連を、Case-control study により検討した。対象は、正常対照 132 例、NTG142 例、POAG88 例である。A1166C 変異 (3' untranslated region) と C⁻⁵²¹→T 変異は、PCR-RFLP 法にて解析した。その結果、A1166C 変異に関しては正常対照と POAG 患者および NTG 患者とで関連はなかったが、C⁻⁵²¹→T 変異に関しては有意差がみられた。

A. 研究目的

緑内障は多因子（多遺伝子）疾患であり、その発症には加齢、環境因子、遺伝的素因等いろいろな因子が関与している。現在、緑内障発症の危険因子として、高眼圧、加齢、人種、近視、糖尿病、心血管障害が考えられている。レニン・アンジオテンシン系 (RA 系) は、腎および血中を中心とした循環血中 RA 系に加え、脳、心、血管壁、脂肪組織、眼組織 (Wheeler-Schilling TH, et al. Euro J Neuroscience 1999;11:3387) など多くの組織において RA 系の構成要素の存在が確認され、それらの組織特異的な発現調節機構や、組織 RA 系の動態と種々の循環器疾患との関連が注目されている。

眼組織においても重要な役割をしていることが報告されている。図 1 にレニン・アンジオテンシン系の概要を示す。今回はアンジオテンシン II 受容体 (AT1) の多型と緑内障との関連を、Case-control study により検討した。

図 1 レニン・アンジオテンシン系



B. 研究方法

1) A1166C 変異 (3' untranslated region)

① PCRプライマー

(A1166C1)

5'-GAG GTT GAG TGA CAT GTT CGA AAC C-3'

(A1166C2)

5'-CGT CAT CTG TCT AAT GCA AAA TGT G-3'

②対象

正常対照：132 例、NTG：142 例、POAG：88

例

③PCR法 (計 15 μl)

DNA (50ng/ μl)	1.0 μl
DW	8.5 μl
PCR buffer	1.5 μl
dNTP	1.5 μl
MgCl ₂	1.8 μl
Primer (A1166C1)	0.3 μl
Primer (A1166C2)	0.3 μl
AmpliQ Gold polymerase	0.1 μl