

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 真島 行彦

平成16(2004)年 4月

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 真島 行彦

平成16（2004）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 真島行彦	-----	1-5
II. 分担研究報告	-----	6-34
1. 開放隅角緑内障におけるミオシリン遺伝子変異 真島行彦、谷原秀信、堀田裕喜	---	6-8
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 真島行彦、谷原秀信、堀田裕喜	---	9-11
3. プタOptinurin (OPTN)のクローニングおよびOPTNとNYOCの発現機構の解析 岩田 岳	---	12-13
4. ミオシリン遺伝子変異診断パネルおよび ミトコンドリア DNA 変異診断パネルの作成 真島行彦、谷原秀信、堀田裕喜	---	14-16
5. 緑内障患者におけるレーベル病に関連するミトコンドリアDNA変異 工藤 純、大竹雄一郎	---	18-19
6. 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 真島行彦、谷原秀信、堀田裕喜	---	20-21
7. 緑内障感受性遺伝子の検索 —レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系— 真島行彦、谷原秀信、堀田裕喜	---	22-23
8. アンギオテンシンII受容体1型拮抗薬と眼圧下降作用の検討 真島行彦	---	24-25
9. 慶應義塾大学病院における開放隅角緑内障患者の受診機転と 視野変化に影響を与える因子 大竹雄一郎	---	26-28
10. 無散瞳眼底写真による緑内障スクリーニング精度と教育効果 大竹雄一郎	---	29-31
11. 眼底写真による緑内障スクリーニング 大竹雄一郎	---	32-34
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	35-37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	38-

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300万人以上存在するが、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るが、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を構築し、671検体を解析し、これを元に日本人特有な変異を検出する診断パネルを開発した。今年度は緑内障発症・進行危険因子として、8遺伝子8遺伝子多型を同定した。高血圧治療薬であるアンギオテンシンII受容体拮抗薬は眼圧下降作用があり、緑内障治療としても期待できる。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システム作りの重要性が認識された。

A. 研究目的

本邦における後天性疾患の失明原因の上位として、糖尿病網膜症、緑内障、加齢性黄斑変性がある。緑内障と加齢性黄斑変性は加齢と共に有病率が上がり、推定約500万人存在する。高齢化社会を迎える日本において、失明への予防と新たな治療法が望まれる。特に緑内障では40歳以上では約5%が罹病し、その90%が正常眼圧緑内障とされ、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。まず、早期発見のために、自覚症の少ない緑内障患者の発見動機の調査を行い、今後の早期発見の為に啓蒙活動およびシステムの構築への参考データベースを作成する。

これらの疾患は多因子（又は多遺伝子）疾患であり、いわゆる生活習慣病と関連してとらえることもできる。我々は、多数の緑内障患者において、高血圧、虚血性心疾患、糖尿病等の血管病に関連する種々の遺伝子多型（SNP）とのCase-control studyを行い、統計学的にそれぞれの遺伝子多型の危険度を明らかにする。これら種々の遺伝子多型を安価で簡単に検出できる診断用パネルを開発し、その後の臨床応用に発展させる。緑内障関連遺伝子や感受性遺伝子多型の情報は、個々の患者における疾患発症の相対危険度と関連するため、これらの遺伝情報は疾患を予防する上でエビデンスとなり、発症の予測、生活指

導により発症の遅延または進行を遅くすることが可能と考える。従って、危険因子を除去することにより、その分緑内障治療薬の投与を軽減することが可能となれば医療費を押さえることができる。また、緑内障点眼および内服治療において、遺伝子多型情報と治療効果や副作用発現頻度との関連を明らかにできれば、緑内障治療上、薬物治療を選択する上で、臨床的に有益な情報となる。緑内障診療において、将来のオーダーメイド医療に向けた日本人の遺伝子多型とその表現型とを関連付けるデータベースの構築は急務であり、東京医療センター（感覚器センター）と共同で構築する。

B. 研究方法

1) 緑内障患者における緑内障遺伝子OPTN変異およびMYOC変異の検索

緑内障患者における変異の有無をスクリーニングするdenaturing high performance liquid chromatographyを利用したWAVE®核酸フラグメント解析システム（TRANSGENOMIC社）を昨年構築したので、多数例（目標500例）の検体を処理する。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。

2) 緑内障遺伝子変異診断パネルの作成

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法に注目した。

3) 緑内障発症・進行に関する緑内障感受性遺伝子の探索

生活習慣病に関連した種々の遺伝子多型に関して、平成14年度に引き続き緑内障患者においてCase-control studyを多数症例で行う。30 SNPsを解析する。対象は、正常対照232例、NTG230例、POAG198例である。検索した緑内障感受性遺伝子多型は、①レニン・アンギオテンシン系、②酸化ストレス関連、③アポトーシス関連、④動脈硬化関連、⑤サイトカイン関連、⑥加齢関連、⑦細胞外マトリックス関連、⑧線溶系、⑨血管作動性関連、⑩ミトコンドリア、⑪接着分子関連、⑫受容体関連等である。

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。

4) アンギオテンシンII受容体拮抗薬による新たな眼圧下降効果作用の応用

ある種の血圧降下剤は眼圧も低下させる機能を持つ。これらの薬物を眼科領域に応用するためのデータを集め、下降効果と関連する遺伝子多型を明らかにする。

5) 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および開放隅角緑内障患者の受診機転を検討し、早期発見のためのプログラム作成の資料とする。

C. 研究結果

1) 緑内障患者における緑内障遺伝子OPTN変異およびMYOC変異の検索

平成14年度に構築した、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した。MYOC変異は開放隅角緑内障患者171名中5名（3%）に検出され、今回新規遺伝子変異を見いだした。MYOC変異の頻度は欧米とほぼ同じであった。また、5家系全例家族性の緑内障であった。OPTN変異は開放隅角緑内障およ

び正常眼圧緑内障患者合計433名中1名（0.25%）に変異が検出された。OPTNは日本人においては非常に希な緑内障遺伝子であった。また、アメリカ人緑内障患者で報告された2つの変異は日本人では多型であった。

2) 緑内障遺伝子変異診断パネルの作成

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にインベーター法による診断パネルのプロトタイプアッセイ法をビー・エム・エル社と共同開発した。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。また、レーベル病に関連する3つのミトコンドリアDNA変異のヘテロプラスミーを定量する検査をインベーター法で解析する診断パネルを開発した。

3) 緑内障発症・進行に関する緑内障感受性遺伝子の探索

①レニン・アンギオテンシン系ではAT1、AT2、レニンに有意差があった。②酸化ストレス関連ではGSTT1多型に有意差があった。③アポトーシス関連では有意差のある多型は無かった。④動脈硬化関連では有意差のある多型は無かった。⑤サイトカイン関連では有意差のある多型は無かった。⑥加齢関連では有意差のある多型は無かった。⑦細胞外マトリックス関連では有意差のある多型は無かった。⑧線溶系では有意差のある多型は無かった。⑨血管作動性関連では、eNOS、エンドセリンに有意差があった。⑩レーベル病に関連するミトコンドリアDNA変異（G3460A変異、G11778A変異、T14484C変異、T9101C変異、G9804A変異、C14498T変異）のヘテロプラスミーをInvader法を用いて検査した結果、7家系に変異が検出された。7家系はいずれもレーベル病は発症していない。⑪接着分子関連では有意差のある多型は無かった。⑫OPTN遺伝子において開放隅角緑内障患者および正常眼圧緑内障患者の両者と有意に関連するアミノ酸置換を伴わない塩基置換を検出した。

4) アンギオテンシンII受容体拮抗薬による新たな眼圧下降効果作用の応用

カンデサルタン（12mg）を用いて、プラセボと比較した結果、明らかに眼圧下降作用が確認された。特に眼圧が高い場合に有効であった。

5) 正常眼圧緑内障および開放隅角緑内障患

者の受診機転

自覚症状の少ない開放隅角緑内障の眼科への受診機転を調査した結果、人間ドックや検診で疑われた症例が多いことが確認された。その場合、視野欠損が進行し、視神経乳頭陥凹がある程度進行して検出され、初期の段階では見逃されている可能性があることが判明した。また、人間ドックでは視神経乳頭所見は無散瞳眼底写真により判定されているが、その場合の陽性確率は30%と低い、更に眼科専門医による眼底検査を施行することにより陽性確率は70%に上昇したので、写真判定だけでは検出率は低いことが判明した。

D. 考察

1) 緑内障患者における緑内障遺伝子OPTN変異およびMYOC変異の検索

OPTN変異は日本人における頻度は0.25%で非常に希な緑内障遺伝子である。またその多くはエキソン4, 5に集中している、この2つの領域のスクリーニングを行えば、検出としては効率的と思われる。MYOC変異の頻度は3%でこれまでの報告と一致している。

2) 緑内障遺伝子変異診断パネルの作成

将来の緑内障感受性遺伝子多型診断パネルのプロトタイプとして、今年はまだ緑内障遺伝子ミオシリン変異を検出する診断パネルを平成16年6月からビー・エム・エル社が委託検査を開始する。

3) 緑内障発症・進行に関する緑内障感受性遺伝子の探索

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、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。

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変異との関連が一部の高齢患者において明らかになったので、緑内障発症と加齢との関係が想定される。患者の中には眼圧が15mm Hg以下にコントロールされたにも拘わらず、視野欠損が進行した症例もあり、ミトコンドリア賦活剤であるCoQ10等の投与も有効と考えられた。

3) アンギオテンシンII受容体拮抗薬による新たな眼圧下降効果作用の応用

今後、新たな緑内障治療薬として期待できると思われる。

4) 正常眼圧緑内障および開放隅角緑内障患者の受診機転

緑内障患者は推定300万人存在し、その20%が実際に眼科を受診しているにすぎないとされている。開放隅角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が、写真判定だけでは検出率は低いことから、教育的なビデオを作成する必要性が考えられた。今後は早期発見への啓蒙活動やシステム作りの重要性が認識された。

E. 結論

今年度は、開放隅角緑内障患者、正常眼圧緑内障患者および正常人を合わせ合計671名を対象に緑内障遺伝子変異および緑内障感受性遺伝子多型のスクリーニングを開始し、それぞれ結果が得られ、幾つかの疾患感受性遺伝子多型を明らかにできた。来年度も更に感受性遺伝子多型の検索を行い、日本人独自のデータベースや遺伝子多型診断パネルを作成する次年度の研究発展のための下地がほぼ完成した。また、これまでに正常眼圧緑内障と診断された契機を調査し、検診の重要性が改めて認識された。しかし、非眼科医による判定が多いので、眼底検査における視神経乳頭陥凹判定の教育ビデオを作成することで検出率を上げる必要がある。

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：緑内障様視神経障害の病態 遺伝因子. 先端医療シリーズ23・眼科 眼科の最新医療. pp153-159 先端医療技術研究所、東京、2003年

真島行彦：緑内障（特集：眼関連遺伝子—最近の知見と今後の展望）眼科 45:1927-1935, 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 107:433-439, 2003.

岩田 岳、真島行彦：インベーター法を用いた緑内障の遺伝子解析 実験医学 Bio Medical Quick Review Net No.4001, 2004年1月

真島行彦：正常眼圧緑内障と遺伝子診断（眼科医の手引き 569）. 日本の眼科 75(1):36, 2004

兼田英子、大竹雄一郎、奥田恵美、木村 至、谷野富彦、真島行彦、小口芳久：無散瞳眼底写真による緑内障スクリーニング精度と教育効果 あたらしい眼科 21(2):261-264, 2004.

佐藤裕理、谷野富彦、大竹雄一郎、木村 至、宮田 博、真島行彦、小口芳久：慶應義塾大学病院における正常眼圧緑内障患者の受診機転 あたらしい眼科 21(3):405-408, 2004

鈴木浩太郎、大竹雄一郎、谷野富彦、山田昌和、真島行彦、小口芳久：眼底写真による緑内障スクリーニング 日本眼科紀要 印刷中

Izumi K, Mashima Y, Obazawa M, Ohtake Y, Tanino T, Miyata H, Tanaka Y, Iwata T. Variants of myocilin gene in Japanese patients with normal tension glaucoma. *Ophthalmic Res* 35:345-350, 2003.

Mashima Y, Nagano M, Funayama T, Zhang Q, Egashira T, Kudoh J, Shimizu N, Oguchi Y. Rapid quantification of the heteroplasmy of mutant mitochondrial DNAs in Leber's hereditary optic neuropathy using the Invader technology. *Clin Biochem* 37:268-276, 2004.

Ishikawa K, Funayama T, Ohtake, Y Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, Suzuki K, Ideta H, Fujumaki T, Tanihara H, Asaoka R, Naoi N, Yasuda N, Iwata T, Mashima Y: A novel MYOC gene mutation, Phe369Leu in Japanese patients with primary open-angle glaucoma detected by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Glaucoma* in press

Obazawa M, Mashima Y, Sanuki N, Noda S, Kudoh J, Shimizu N, Oguchi Y, Tanaka Y, Iwata T. Comparable analysis of porcine optineurin and myocilin expression in trabecular meshwork cells and astrocytes from optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* in press

2. 学会発表

船山智代、真島行彦、大竹雄一郎、谷野富彦、黒坂大次郎、工藤 純、清水信義、小口芳久：原発開放隅角緑内障患者における Optineurin 遺伝子解析 日本人類遺伝学会第 48 回大会 平成 15 年 10 月

相馬久美子、大竹雄一郎、石川果林、佐藤裕理、木村 至、谷野富彦、真島行彦、小口芳久：開放隅角緑内障の受診機転および家族歴 第 14 回日本緑内障学会 平成 15 年 9 月

石川果林、橋爪公平、吉田和秀、谷野富彦、大竹雄一郎、黒坂大次郎、船山智代、真島行彦：緑内障における遺伝子多型の検討 第 10 回日本遺伝子診療学会大会 平成 15 年 7 月

真島行彦、船山智代、小口芳久、工藤 純、清水信義、長野 誠、江頭 徹：Invader 法を用いたミトコンドリア DNA のヘテロプラスミ一定量法 第 10 回日本遺伝子診療学会大会 平成 15 年 7 月

兼田英子、大竹雄一郎、木村 至、谷野富彦、

真島行彦、小口芳久：研究医における眼底写真判定緑内障スクリーニングの教育効果 第107回日本眼科学会総会 平成15年4月

岩田 岳、讃岐奈緒子、真島行彦、田中靖彦：水晶発振マイクロバランスを用いた OPTN と RAB8 の分子間相互作用の解析 第107回日本眼科学会総会 平成15年4月

尾羽澤 実、真島行彦、讃岐奈緒子、野田節子、工藤 純、清水信義、田中靖彦、岩田 岳：ブタ OPTN のクローニングおよび OPTN と MYOC の発現機構の解析 第107回日本眼科学会総会 平成15年4月

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
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
石川 果林	慶應義塾大学医学部
相馬 久美子	慶應義塾大学医学部
稲垣 陽子	慶應義塾大学医学部
兼田英子	慶應義塾大学医学部
鈴木浩太郎	慶應義塾大学医学部

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

開放隅角緑内障におけるミオシリン遺伝子変異

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 石川果林 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、平成14年度に構築したミオシリン遺伝子変異検出システム（WAVE®核酸フラグメント解析システム）を臨床応用し、日本人のミオシリン遺伝子頻度を検討した。今年度に開放隅角緑内障患者171名から5名（3%）に遺伝子変異が検出された。

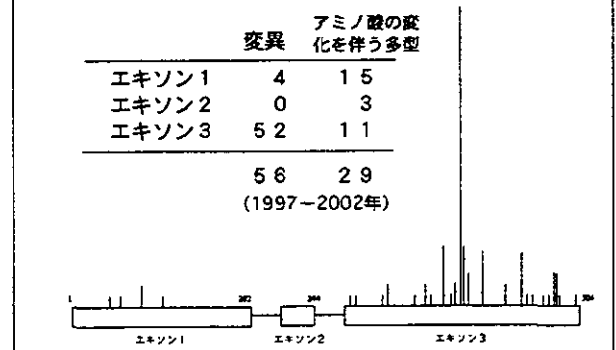
A. 研究目的

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、変異はエクソン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）。平成14年度に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を構築したの

で、今年度は日本人緑内障患者において遺伝子変異のスクリーニングを行った。

表1 ミオシリン遺伝子変異の位置と頻度



B. 研究方法

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

表2 ミオシリン遺伝子解析用のPCRプライマー条件およびDHPLC条件

Exon	Primer sequences (5' to 3')	Product size (bp)	PCR Tm (°C)	DHPLC Tm (°C)
1A	F AGC ACA GCA GAG CTT TCC AGA GGA	302	58.0	61.9
	R CTC CAG GTC TAA GCG TTG G			
1B	F CAG GCC ATG TCA GTC ATC CA	298	58.0	61.2, 64.5
	R TCT CAT TTT CTT GCC TTA GTC			
1C	F GAA ACC CAA ACC AGA GAG	255	58.0	61.0, 63.5
	R ATA TCA CCT GCT GAA CTC AGA GTC			
2A	F CCT CAA CAT AGT CAA TCC TTG GCC	245	58.0	56.3, 59.3
	R ACA TGA ATA AAG ACC ATG TGG GCA			
3A	F GAT TAT GGA TTA AGT GGT GCT TCG	375	58.0	59.3, 61.3, 62.3
	R TGT CTC GGT ATT CAG CTC AT			
3B	F CAT ACT GCC TAG GCC ACT GGA	337	58.0	60.9, 61.4
	R ATT GGC GAC TGA CTG CTT AC			
3C	F GAA TCT GGA ACT CGA ACA AA	333	58.0	59.7, 61.7
	R CTG AGC ATC TCC TTC TGC CAT			

社)を用いてスクリーニングを行った。PCR法の条件と DHPLC 法の条件は表 2 に示す。

171 名分の検体をスクリーニングするに当たり、3 人分の検体を混ぜて DHPLC 法でスクリーニングし、移動度に変化がみられた場合は、3 検体各々解析する。

一方、1 人の患者をスクリーニングする方法を以下に述べる。

- 1) 96 穴プレートを用いて、プレート PCR 法で 7 カ所のエク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、各エクソン領域を 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。

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。

対象は、POAG 患者 171 名、正常人 100 名で、採血時の平均年齢はそれぞれ 55.1 ± 16.0 歳と 70.5 ± 10.6 であった。

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

今回、POAG 患者 171 名中 5 名 (3%) に遺伝子変異が検出された (表 3)。Phe369Leu 変異は新規に確認された日本人特有の変異であった。多型は 13 種類が確認された。

図 1 に Phe369Leu 変異を持つ患者の DHPLC パターンを示す。エクソン 3 B 領域に塩基置換の存在が確認された。

図 2 にエクソン 3 B 領域の直接塩基配列決定法により確認された Phe369Leu 変異の塩基配列を示す。フェニルアラニン (TTC) からロイシン (CTC) に変化している。

表 3 日本人におけるミオシリン遺伝子変異および多型

Exon	Sequence change	Amino acid change	Frequency	
			patients	controls
変異	3 c.1079T>A	Ile360Asn	1/171	0/100
	3 c.1087G>A	Ala363Thr	2/171	0/100
	3 c.1105T>C	Phe369Leu	1/171	0/100
	3 c.1342A>C	Thr448Pro	1/171	0/100
多型	1 c.34G>C	Gly12Arg	1/171	2/100
	1 c.57G>T	Gln19His	1/171	1/100
	1 c.136C>T	Arg46Stop	1/171	1/100
	1 c.210C>T	Val70Val	2/171	0/100
	1 c.227G>A	Arg76Lys	14/171	9/100
	1 c.369C>T	Thr123Thr	1/171	0/100
	1 c.473G>A	Arg158Gln	1/171	1/100
	2 c.611C>T	Thr204Met	0/171	1/100
	2 c.624C>G	Asp208Glu	5/171	2/100
	3 c.864C>T	Ile288Ile	1/171	0/100
	3 c.1110G>A	Pro370Pro	0/171	1/100
	3 c.1441C>T	Pro481Ser	1/171	0/100
	3 c.1464C>T	Ala488Ala	3/171	1/100

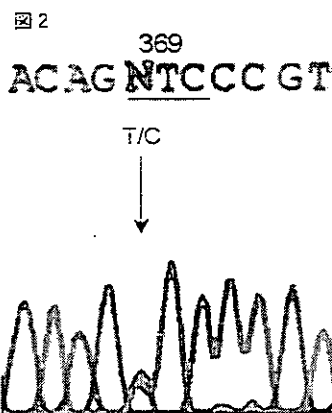
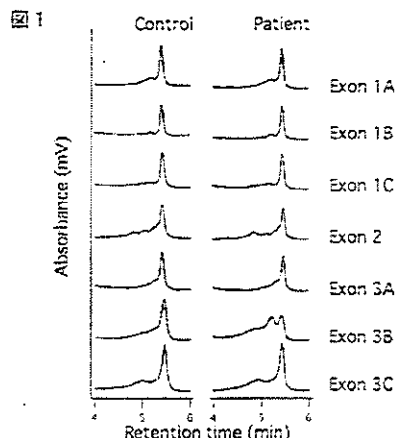
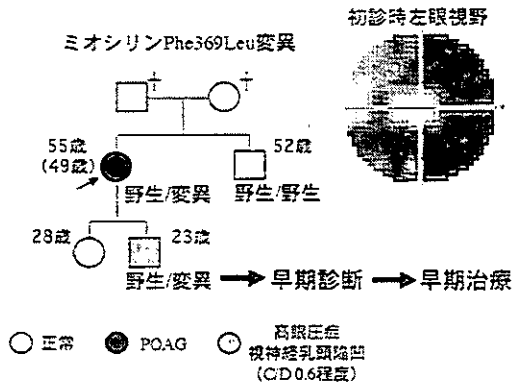


図 3 に Phe369Leu 変異を持つ家系図を示す。発端者は 49 歳時に眼の重みを自覚し眼科を受診した。眼圧は両眼とも 30mm Hg であり、左

眼は視野欠損が進行していた。長男の遺伝子検査を施行した所、同変異が見られたため診察した結果、眼圧は 20 台前半で、視神経乳頭陥凹は 0.6 であった。静的視野検査では異常は無かった。

図 3 緑内障遺伝子診断の意義



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。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)。

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。

今回の POAG 171 名の検討では、5 名 (3%) にミオシリン遺伝子変異が検出され、これまでの報告と同じであった。検出された変異は日本人特有の変異であり、今回 Phe369Leu 変異という新規遺伝子変異が確認された。発端者は 49 歳の女性であった。その長男も同意の上遺伝子検査を行ったが、同じ変異を持っており、高眼圧症および視神経乳頭陥凹がみられ、同一家系内で遺伝子検査することにより、早期に診断が可能であり、治療を開始した。長男は早期に治療を開始することにより、母親の様な視野欠損を来す可能性は少なくなった。

E. 結論

日本人の POAG 患者におけるミオシリン遺伝子変異の頻度は 3% であった。推定 300 万人の緑内障患者数を考えると約 9 万人がミオシリン変異を持つことになる。同一家系において遺伝子診断を行うことで、未発症者の早期診断、早期治療が可能であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Ishikawa K, Funayama T, Ohtake, Y Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, Suzuki K, Ideta H, Fujumaki T, Tanihara H, Asaoka R, Naoi N, Yasuda N, Iwata T, Mashima Y: A novel MYOC gene mutation, Phe369Leu in Japanese patients with primary open-angle glaucoma detected by denaturing high-performance liquid chromatography. J Glaucoma in press

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、His26Asp 変異が433家系中1家系(0.5%)に確認されたが、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稀と思われた。また、Thr34Thr(412G>A) 多型は、開放隅角緑内障患者と有意な関連があった。

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)。

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

対象を表2に示す。

表1 緑内障遺伝子 *Optinurin (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%)

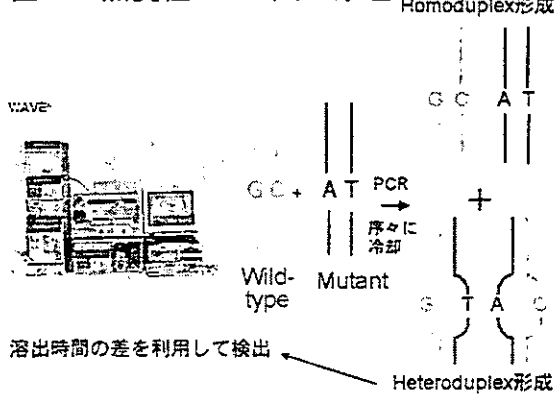
原発開放隅角緑内障 (POAG)	194例
男性 110例、女性84例	
平均年齢 65.1±12.0 歳	
正常眼圧緑内障 (NTG)	232例
男性 108例、女性124例	
平均年齢 58.8±13.6 歳	
正常群(Control)	218例
男性 92例、女性126例	
平均年齢 70.6±10.9 歳	

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

遺伝子における塩基の変化を効率よく検出

するシステムとして、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) を用いた。原理を図 1 に示す。

図 1 熱変性HPLC法の原理



方法

- 1) 採血 (倫理委員会承認)
- 2) ゲノムDNAの抽出
- 3) PCR (Polymerase Chain Reaction)
- 4) WAVE核酸フラグメント解析システム (DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography) 3検体混合し解析
- 5) Direct sequencing

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

図 2 にエクソン 4 領域で同定された DHPLC 法による塩基置換のパターンを示す。OPTN 遺伝子の 1-3 個のエキソン領域の解析結果を表 3 に示す。疾患の原因となる遺伝子変異は His26Asp が同定された。

Thr34Thr (412G>A) 多型において、A アレルは開放隅角緑内障患者に有意に関連していた (表 4)。オッズ比は 1.75 であった。

図 2 DHPLC法によるOPTN遺伝子エクソン 4 領域の解析

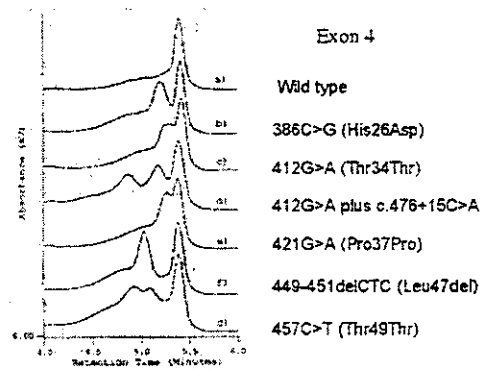


表 3 OPTN解析結果

Location Exon	Sequence Change	Codon Change	POAG	NTG	Control
4	c.386C>G	His26Asp	1/194	0/232	0/218
4	c.449_451del	Leu47del	0/194	0/232	1/218
5	c.603T>A	Met98Lys	31/189	50/232	36/218
16	c.1944G>A	Arg545Gln	10/186	15/222	11/218
4	c.412G>A	Thr34Thr	69/194	74/232	52/218
4	c.421G>A	Pro37Pro	0/194	1/232	0/218
4	c.457C>T	Thr49Thr	1/194	0/232	0/218
16	c.2023C>T	His571His	0/186	0/232	2/218

表 4 OPTN 412G>A (Thr34Thr)多型

臨床型	n	Allele frequency (%)		p value*	(相対危険度) オッズ比
		G	A		
POAG	194	311 (80.2)	77 (19.8)	0.003	1.75
NTG	232	382 (82.3)	82 (17.7)	0.027	1.52
H-NTG [‡]	168	272 (81.0)	64 (19.0)	0.011	1.66
L-NTG [§]	64	110 (85.9)	18 (14.1)	0.617	1.16
Control	218	382 (87.6)	54 (12.4)		

* p value for χ^2 test.

‡ H means high-teen NTG. Maximum IOP ≥ 16 mmHg.

§ L means low-teen NTG. Maximum IOP ≤ 15 mmHg.

一方、欧米人で危険因子とされた Met98Lys (603T>A) (表 5)、または変異とされた Arg545Gln (1944G>A) (表 6) は日本人においては多型であった。

表5 603T>A (Met98Lys)多型

臨床型	n	Allele frequency (%)		p value*	相対危険度 オッズ比
		T	A		
POAG	189	346 (91.5)	32 (8.5)	0.992	0.997
NTG	232	409 (88.1)	55 (11.9)	0.096	1.450
H-NTG‡	168	294 (87.5)	42 (12.5)	0.068	1.540
L-NTG §	64	115 (79.7)	13 (20.3)	0.559	1.219
Control	218	399 (91.5)	37 (8.5)		

* p value for χ^2 test.

表6 1944G>A (Arg545Gln)多型

臨床型	n	Allele frequency (%)		p value*
		T	A	
POAG	201	362 (97.3)	10 (2.7)	0.988
NTG	232	409 (88.1)	55 (11.9)	0.096
H-NTG‡	168	294 (87.5)	42 (12.5)	0.068
L-NTG §	64	115 (79.7)	13 (20.3)	0.559
Control	218	399 (91.5)	37 (8.5)	

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。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。

アメリカにおいては3種類の変異が54家系中9家系、16.7%にみつかった。また、Met98Lys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。しかしながら今回の検査では、Met98LysおよびArg545Glnの頻度は正常人と緑内障患者で有意の差はなかったことから、日本人においては多型と考えられた。

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であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

船山智代、真島行彦、大竹雄一郎、谷野富彦、黒坂大次郎、工藤純、清水信義、小口芳久：原発開放隅角緑内障患者におけるOptineurin遺伝子解析 日本人類遺伝学会第48回大会 平成15年10月(長崎)

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

ブタ Optinurin(OPTN)のクローニングおよび OPTN と MYOC の発現機構の解析

分担研究者 岩田 岳 国立東京医療センター 室長
研究協力者 尾羽澤 実 慶應義塾大学医学部

研究要旨：今回ブタ MYOC および OPTN のクローニングを行った。ブタ線維柱帯 (TMC) および視神経乳頭部より分離培養したアストロサイト (AS) をステロイド、低酸素、そして水圧下で培養して OPTN および MYOC の発現を同時に測定した。ステロイドより追加に MYOC の発現は増加したが、OPTN は減少した。低酸素による影響は、MYOC の発現は著明に抑制されたが、OPTN は影響を受けなかった。+30mmHG の水圧下による培養では OPTN および MYOC の発現はそれ程影響を受けなかった。OPTN と MYOC はいずれも TMC と AS で発現しているがその発現機構は大きく異なっており、緑内障の発症機序が異なることが示唆された。

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 (Rezaie T, et al. Science 2002;295:1077)。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。

ブタ MYOC のクローニングについて我々はすでに報告しているが、今回ブタ OPTN のクローニングを行った。ブタ線維柱帯 (TMC) および視神経乳頭部より分離培養したアストロサイト (AS) をステロイド、低酸素、そして水圧下で培養して OPTN および MYOC の発現を同時に測定した

B. 研究方法

培養ブタ TMC および As を実験に用いた。ブタ TMC から mRNA を抽出し、ヒト、マウス、及びラットの OPTN 核酸配列から配列が一致する部分で primer を設計して RT-PCR 法を行い、ブタ OPTN 遺伝子の一部を増幅した。残りの上流および下流の配列は、それぞれ 5'3'RACE 法により決定した。一方、TMC および As をコンフルエントになるまで培養し

た後、培養液中にデキサメサゾン 500nM (2週間)、7%低酸素 (2日) または+30mmHG の水圧下 (3日) で培養した。培養細胞より Total RNA を抽出し、ブタ OPTN および MYOC mRNA の発現レベルを、real-time quantitative PCR 法により測定した。

C. 研究結果

ブタ OPTN 蛋白は574個のアミノ酸からなり、ヒト OPTN タンパク質との相同性は84%であった (図1)。

ブタ MYOC 蛋白は489個のアミノ酸からなり、ヒト MYOC タンパク質との相同性は82%であった (図2)。

MYOC の発現に関してデキサメサゾン添加による影響は、TMC では約8倍、AS では約6倍であった (図3B)。一方、OPTN の発現は両細胞において抑制された (図3A)。

7%低酸素 (2日) による影響は、MYOC の発現は両細胞において72時間で著明に抑制されたが、OPTN は影響を受けなかった。

+30mmHG の水圧下 (3日) による培養では OPTN および MYOC の発現はそれ程影響を受けなかった。

D. 考察

ブタ OPTN の発現は MYOC とは異なり DEX 投与により TMC と AS で低下した。低酸素では MYOC が著しく低下したが OPTN は影響を受けなかった。水圧による双方の遺伝子発現は全く観察されなかった。種々のストレス下

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

ミオシリン遺伝子変異診断パネルおよびミトコンドリア DNA 変異診断パネルの作成

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 石川果林 慶應義塾大学医学部

研究要旨：インベーター法を用いて日本人に特有な5つのミオシリン遺伝子変異とミトコンドリア DNA 変異の有無とヘテロプラスミー定量できる診断パネルを作成した。これらの検査はいずれも、株式会社ビー・エム・エル社から提供される。

A. 研究目的

本邦においては、開放隅角緑内障（POAG）患者の有病率は40歳以上では約4%で、推定300万人存在するとされている。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。従って、ミオシリン変異をもつ患者は少なくとも9万人存在することになる。また、300万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。

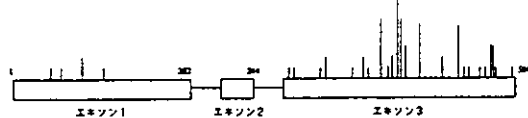
現在まで、ミオシリンの50か所以上のアミノ酸変異が確認されているが、変異はエキソン3のオルファクトメジン様ドメインに集積している（表1）。平成15年度に日本人緑内障患者において遺伝子変異のスクリーニングを行い5家系に変異が検出された（表2）。これらの変異を多数症例で検出するためには、簡便かつ正確なスクリーニング法が必要である。我々はインベーター法に注目した。

表2 日本人におけるミオシリン遺伝子変異および多型

変異	Exon	Sequence change	Amino acid change	Frequency	
				patients	controls
変異	3	c.1079T>A	Ile360Asn	1/171	0/100
	3	c.1087G>A	Ala363Thr	2/171	0/100
	3	c.1105T>C	Phe369Leu	1/171	0/100
	3	c.1342A>C	Thr448Pro	1/171	0/100
多型	1	c.34G>C	Gly12Arg	1/171	2/100
	1	c.57G>T	Gln19His	1/171	1/100
	1	c.136C>T	Arg46Stop	1/171	1/100
	1	c.210C>T	Val70Val	2/171	0/100
	1	c.227G>A	Arg76Lys	14/171	9/100
	1	c.369C>T	Thr123Thr	1/171	0/100
	1	c.473G>A	Arg158Gln	1/171	1/100
	2	c.611C>T	Thr204Met	0/171	1/100
	2	c.624C>G	Asp208Glu	5/171	2/100
	3	c.864C>T	Ile288Ile	1/171	0/100
	3	c.1110G>A	Pro370Pro	0/171	1/100
	3	c.1441C>T	Pro481Ser	1/171	0/100
	3	c.1464C>T	Ala488Ala	3/171	1/100

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

診断パネルの作成は、株式会社ビー・エム・エル社に委託した。

5つのミオシリン遺伝子変異を検出するインベータープローブ、変異検出プローブを表3に示した。

ミトコンドリア DNA 変異を検出するインベータープローブ、変異検出プローブを表4に示した。

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。

表3 インベータープローブ

Mutation	Nucleotide	Target	Probe	Sequence	Tm	Dye
Ile360Asn	T→A	Sense	Wild	CGCGCCGAGGatttccttctcagccttc	62.7	FAM
			Mutant	ACGGACGCGGAGtttcttctcagccttc	62.8	RED
			Invader	tgctcgtggttagccagctccagggc	77.5	
			Wild control	cagtgaaggctgagaaggaaaatccctggagctggctaccacggacagt		
			Mutant control	cagtgaaggctgagaaggaaaacccctggagctggctaccacggacagt		
Ala363Thr	G→A	Anti-sense	Wild	ACGGACGCGGAGgctggctaccacg	61.1	RED
			Mutant	CGCGCCGAGGactggctaccacgg	63.1	FAM
			Invader	agacagtgaaggctgagaaggaaaatccctggat	77.0	
			Wild control	ctgtccgtggttagccagctccagggttcttctcagccttctcactgtctcg		
			Mutant control	ctgtccgtggttagccagctccagggttcttctcagccttctcactgtctcg		
Gly367Arg	G→A	Anti-sense	Wild	ACGGACGCGGAGggacagttcccgtattc	62.6	RED
			Mutant	CGCGCCGAGGgacagttcccgtattct	63.4	FAM
			Invader	gagaaggaaaatccctggagctggctaccact	76.8	
			Wild control	ccaagaatacgggaactgtcctgtgtagccagctccagggttcttctcag		
			Mutant control	ccaagaatacgggaactgtcctgtgtagccagctccagggttcttctcag		
Pro370Leu	C→T	Sense	Wild	ACGGACGCGGAGgggaactgtccgtg	61.2	RED
			Mutant	CGCGCCGAGGggaactgtccgtg	63.6	FAM
			Invader	caagtcaatgtccgtgtagccacccaagaatact	76.8	
			Wild control	gctaccacggacagttcccgtattcttggggtggctacacggacattgacttggc		
			Mutant control	gctaccacggacagttcccgtattcttggggtggctacacggacattgacttggc		
Thr448Pro	A→C	Sense	Wild	CGCGCCGAGGtagcatctgtgaggt	62.7	FAM
			Mutant	ACGGACGCGGAGgagcatctgtgaggg	61.8	RED
			Invader	acctgtgctgtgtcataagcaaagttgacggc	77.3	
			Wild control	ctacacctcagcagatgctaccgtcaactttgcttatgacacaggcacaggtat		
			Mutant control	ctacacctcagcagatgctaccgtcaactttgcttatgacacaggcacaggtat		

大文字塩基：Flap 配列

表4 インベータープローブ

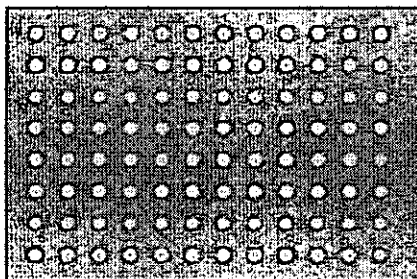
Position Mutation	Nucleotide	Target	Probe	Sequence	Tm	Dye
NADH dehydrogenase subunit 1 Ala52Thr	G3460A	Anti-sense	Wild	ACGGACGCGGAGgccataaaaactcttcacca	63.2	RED
			Mutant	CGCGCCGAGGaccataaaaactcttcaccaa	63.3	FAM
			Invader	ccctacgggctactacaaccttcgctgact	77.7	
NADH dehydrogenase subunit 4 Arg340His	G11778A	Anti-sense	Wild	ACGGACGCGGAGgcatcataatcctctctcaag	63.5	RED
			Mutant	CGCGCCGAGGacatcataatcctctctcaag	62.2	FAM
			Invader	gcctagcaaaactcaaaactcgaacgcactcagctct	77.7	
NADH dehydrogenase subunit 6 Met64Val	T14484C	Sense	Wild	CGCGCCGAGGatggtgtctttggatatactac	63.4	FAM
			Mutant	ACGGACGCGGAGgtggtgtctttggatatactac	62.8	RED
			Invader	ttttggggagggttatatgggttaaatagtttttaatttttttagggggaatgt	76.0	

The Large letters indicates the flap sequences of primary probes.

C. 研究結果

ミオシリン遺伝子変異検出はポジティブコントロールを用いて、反応することが確認された。

診断パネル



ミトコンドリア DNA 変異に関して、G11778A 変異のヘテロプラスミーの定量結果を図1に示す。DNA を作成後1時間で結果が得られる。

D. 考察

遺伝子変異診断パネルは今後多数例において有効な検査法と思われる。

E. 結論

日本人特有の5つのミオシリン遺伝子変異を検出する診断パネルとミトコンドリア DNA

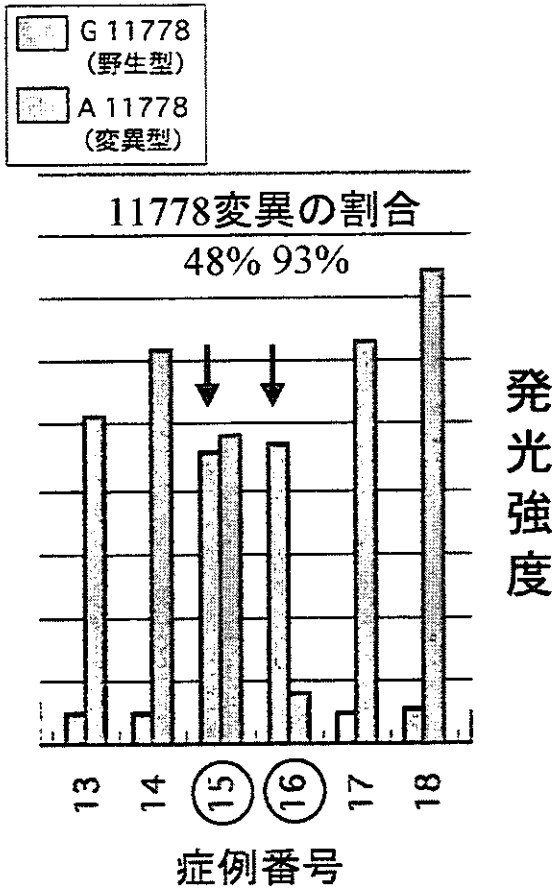
ヘテロプラスミーを定量する診断パネルを開発し、臨床応用が可能である。

37:268-276, 2004.

図1 インベダー法によるミトコンドリアDNAのG11778A変異のヘテロプラスミーの定量結果

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



F. 健康危険情報

特になし

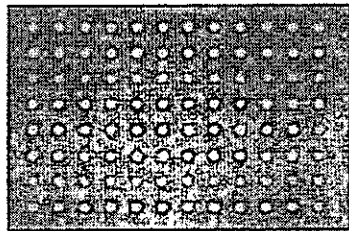
G. 研究発表

真島行彦、船山智代、小口芳久、工藤 純、清水信義、長野 誠、江頭 徹: 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 第10回日本遺伝子診療学会大会 平成15年7月

Mashima Y, Nagano M, Funayama T, Zhang Q, Egashira T, Kudoh J, Shimizu N, Oguchi Y.
Rapid quantification of the heteroplasmy of mutant mitochondrial DNAs in Leber's hereditary optic neuropathy using the Invader technology. Clin Biochem



◆遺伝子検査◆
国立感覚器セ、巨大、BML、
緑内障の遺伝子検査パネルプロトタイプ開発、主要病院に配布へ



国立感覚器センター主任研究員の岩田岳氏、慶応義塾大学眼科学講座助教授の真島行彦氏らとビー・エム・エル（BML）の研究グループは、緑内障原因遺伝子変異のパネル検査の最初のプロトタイプを完成させたことをこのほど明らかにした。迅速、低コストで遺伝子の変異を検出できるInvader技術を用いて、今までに報告されている3つの遺伝子にある合計23個の変異を検出するものだ。

岩田氏は、全国の国立病院や慶応義塾大学、順天堂大学などの主要病院に遺伝子検査パネルを配布して、医療現場で測定してもらう計画だ。各病院の評価がよければ、BMLでも受託検査を実施していく。岩田氏は、1000例を目標にデータを集め、病態と遺伝子変異の関係を調べ、どういった変異があればどういう病態が起こるのか明らかにすることを目指している。治療の選択などにもつながる可能性がありそうだ。岩田氏は、既にインフォームド・コンセントを得た患者の情報をウェブ上で登録できる症例登録システムの開発にも成功している。また、プロトタイプで慶応義塾大学の検体を調べたところ、良い結果が得られているという。

緑内障は、一般的に眼圧の上昇で視神経が圧迫されて萎縮を生じ、そのままにしておくと最終的には失明する疾患。わが国の失明原因の第2位を占めているが、わが国では、正常眼圧の患者も多い。緑内障遺伝子は、少なくとも8つの遺伝子の存在が報告されている。そのうち、ミオシリン（MYOC、TIGR遺伝子と同じもの）とオプテニューリン（OPTN）、シトクロムP4501B1（CYP1B1）の3つが同定されている。開発されたパネルは、MYOCの6変異、OPTNの4変異、CYP1B1の13変異を検出できる。緑内障発症遺伝子の変異は多種類報告されており、開発されたパネルはごく一部にすぎないが、将来的には緑内障全てをカバーできるパネル検査に発展することも期待できそうだ。

BMLは、Invader法を利用した一塩基多型（SNPs）解析について業務提携し、試薬の開発などを進めている。今回開発に成功したパネル検査とは別に、信州大学と難聴のパネル検査の開発も行っている。