

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

若年性黄斑変性カニクイザルの病理学的
および分子生物学的解析

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年3月

主任研究者 岩田 岳

目 次

I. 総括研究報告書

若年性黄斑変性カニクイザルの病理学的および分子生物学的解析

岩田 岳

吉川 泰弘

溝田 淳

II. 分担研究報告書

1. 若年性家族性網膜黄斑変性カニクイザル家系の維持と繁殖供給システムの構築

寺尾 恵治

2. ハイビジョン立体映像技術を応用した細隙灯顕微鏡観察システムの開発

野田 徹

3. 質量分析による疾患組織及び血漿の組成解析

西村 俊秀

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

主任研究者 岩田 岳 独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター*
細胞・分子生物学研究室長
分担研究者 吉川 泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科** 教授
分担研究者 溝田 淳 千葉大学大学院医学研究院眼科重粒子線治療学視覚病態学 講師
研究協力者 梅田 慎介* ** 大学院生
研究協力者 岡本 はる* 流動研究員

研究要旨：黄斑変性カニクイザルの全体像を把握するために専門分野の異なる研究者が集まり、病理学的、遺伝学的そして最新のプロテオミクス技術を用いて多面的な解析を開始した。

A. 研究目的

黄斑は角膜と水晶体によって収束した光が網膜上で結像する領域で、視覚を司る視細胞が最も密に集中しており、視力を決定する重要な部位である。ここが障害されると著しい視力低下、ひいては法的失明に至り、代表的な疾患としては、成長期に起こる各種黄斑ジストロフィ、加齢とともに起こる加齢黄斑変性などがある。加齢黄斑変性は西側先進国では徐々に増加しており、米国では65歳以上の失明原因として最も多い加齢性の眼疾患である。日本でも高齢化が進み、診断装置が普及するにしたがって加齢黄斑変性の患者数は増加の一途をたどっており、その原因解明と治療法の開発は急務である。黄斑は解像度の高い視力が要求される霊長類や鳥類で発達しており、通常実験動物として利用されているラットやマウスなどの夜行性のゲツ歯類には存在しない。加齢黄斑変性はその発症過程の詳細は未だ明らかとなっておらず、その原因の一つとして黄斑を持つモデル動物が存在しないことがあげられる。

最近我々は国立感染症研究所筑波霊長類センターで若年性あるいは加齢性の黄斑変性カニクイザルを発見し、その疾患部（網膜色素上皮細胞—ブルッフ膜）における蓄積物（ドルーゼン）の組成がヒトと類似していることを発見した。ドルーゼンの生成は加齢黄斑変性の特徴で、ヒトでは50歳以上で蓄積が観察されているが、若年黄斑変性カニクイザルの場合には生後2年で観察される。短い期間で病態の進行を解析できるこのモデル動物は、国立感染症研究所霊長類センターにのみ存在し、世界的に見ても貴重である。現在の診断法や治療法は主に病気の末期で観察される新生血管にターゲットが絞られており、ドルーゼンが観察される初期における情報はきわめて乏し

い。新生血管が増殖するはるか以前に黄斑部周辺でどのような異変が生じるのか、疾患の原因解明と有効な治療法・診断法の確立をめざす。生後2年でドルーゼンを生成する若年黄斑変性カニクイザルを利用することにより、ヒトの30分の1という短い期間で治療効果が期待できる疾患モデル動物である。

B. 研究方法

今年度は事業計画の最初の年であることから、疾患ザルを多面的に解析するために、異なる視点から複数の実験を同時に開始した。実験の第一の目標はこの疾患動物の病態とヒトの黄斑変性との類似性を明らかにすることである。今回行われた眼底検査等によってヒトと類似する点について検討が行われた。

遺伝性の疾患サルについては疾患個体と複数の正常あるいは疾患個体との間で交配が行われ、260頭を超える大家系に成長しており、それぞれの個体から得られたDNAを連鎖解析することにより、原因遺伝子の染色体座位の検索が行われている。すでに複数の若年性遺伝子がヒトで発見されていることから、これらを全てカニクイザルでクローニングして、疾患家系の個体について遺伝子解析を行った結果、ヒトの黄斑変性原因遺伝子はこの家系については関与していないことが明らかになった。すなわち未知の遺伝子が原因である可能性が高い。また、加齢性の疾患サルについては網膜切片の免疫染色による病理学的解析を行った結果、疾患部における補体の活性化、血漿成分の蓄積が確認された。現在、ドルーゼン部分をマイクロダイ

セクション法によって切り取り、質量分析計によって組成の同定が行われている。ドルーゼンにおける血漿成分の蓄積は同時に血漿中に網膜成分が含まれている可能性を示唆しており、血漿解析による疾患マーカーの検索も進行中である。加齢性の疾患であることから自己免疫の可能も追求している。ウエスタンブロット法によって網膜成分に反応する抗体の存在を検索中である。次年度ではこれらの結果が出揃うことが期待される。

C. 研究結果

国立感染症研究所筑波霊長類センターで発見された若年性及び加齢性黄斑変性カニクイザルについて病理学的、分子生物学的、遺伝学的解析を行い、原因遺伝子の検索、ドルーゼン構成成分の同定などを行った。

(1) 若年黄斑変性カニクイザルの臨床診断、ERG (網膜電図)、FAG (蛍光眼底撮影)、血液採取

トロピカマイド点眼による散瞳後、麻酔下で単眼・あるいは双眼倒像鏡による眼底検査および、眼底カメラによる眼底写真撮影を行い、黄斑変性をはじめとする黄斑部の異常所見、特にドルーゼンの有無を記録した。さらに、フルオレセインナトリウム静注を行い、フィルターを用いて経時的に蛍光眼底撮影を行い、ヒトの加齢黄斑変性で起こりうる新生血管の有無や網膜色素上皮異常などを蛍光色素漏出や過蛍光などから観察した。また、疾患と正常個体について網膜電図を測定し、網膜視神経障害を調べた。

(2) 候補遺伝子のクローニングおよび遺伝子変異の解析

ヒト黄斑変性（加齢性でない）の原因遺伝子（ELOVL4, TIMP, ABCA4, RDS, VMD2, EFEMP1）のうちRDS以外の遺伝子についてはこれをクローニングして、各遺伝子のエクソンの塩基配列を明らかにした。疾患個体のDNAについてそれぞれのエクソンの遺伝子変異解析を行った。多数の遺伝子多型が発見されたが、疾患と連鎖する遺伝子変異はまだ見つかっていない。

(3) 若年性黄斑変性カニクイザル家系の連鎖分析

すでにヒトの染色体マーカーの60%がカニクイザルの分析に利用できることが確認されていることから、260頭からなる大家系について連鎖解析を開始した。まずはヒト黄斑変性の原因

遺伝子である、ELOVL4, TIMP, ABCA4, RDS, VMD2, EFEMP1のローカスに集中し、これに連鎖するか解析が行われた。その結果、何れの遺伝子についても連鎖が観察されず、候補遺伝子による結果と一致した。この結果から疾患の原因遺伝子が未知遺伝子であることが推測された。今後は全ゲノム解析に切り替える。

(4) 疾患黄斑部の病理学的解析

疾患個体黄斑部の電子顕微鏡による病理学的解析を行った。また、加齢性の疾患個体についてはその網膜切片についてヒトで報告されているドルーゼンの構成成分に対する抗体を用いて免疫染色を行った結果、ヒトと類似していることが明らかとなった。特に、血漿成分の蓄積、補体の活性化がドルーゼン周辺で起こっていることが確認され、血液の関与が明らかとなった。

(5) 疾患組織および血漿の質量分析計による組成解析

疾患個体から得られたドルーゼンの組成を調べるために、ドルーゼンの切り出し方から検討が行われた。エッペンドルフ社のマイクロダイセクション機を用いて切り出しが行われ、質量分析装置による分析が進行中である。さらに、方法の改良によって実体顕微鏡とマニピュレーターを組み合わせた装置による疾患網膜からのドルーゼンの回収を試みる。

(6) 質量分析計による血漿成分の解析と疾患マーカーの検索

正常と疾患個体について血漿中に含まれるタンパク質の比較を行い、疾患個体特有に現れるタンパク質の検索を始めた。また、網膜抽出液と疾患及び正常個体の血清を用いて、自己抗体の検索が行われ、5つのタンパク質が分離されて、これらを質量分析計によって解析中である。

D. 考察

様々な視点から実験が行われた結果、この黄斑変性カニクイザルについて、その全体像を明らかになりつつある。特に大家系を構成していることから連鎖解析が行われ、これまでに報告されている全ての黄斑変性原因遺伝子のローカスについてその関連性が排除された。また、これらの遺伝子についてカニクイザルでクローニングを行い、シーケンズによって正常と疾患の塩基配列を比較したが、疾患個体と連鎖する遺伝子変異を発見するには至っていない。これらの事実から疾患の原因遺伝子は未知の可能性がある。

疾患個体の詳細な眼底検査によってドルーゼン様黄白色斑点が黄斑部を中心に網膜全体に広がって現れることが確認された。3歳の疾患個体ではすでに黄斑部のみに少数ではあるが斑点が現れており、網膜黄斑部と周辺部の現れ方の差について検討が必要である。

ドルーゼンの構成成分についてはすでにヒトで一部が明らかとなっており、免疫染色法によって疾患サルにも共通する組成が存在することを明らかにした。質量分析計による解析も平行して試みており、その結果待ちの状態である。ドルーゼンの組成に血漿成分が含まれていることから、逆に血漿中に網膜由来の成分が含まれている可能性があり、超高感度の質量分析計による血漿解析による疾患マーカーの検索も検討中である。さらに、自己抗体産生の可能性についても検討している。

時間のかかるカニクイザルの繁殖について班会議で検討が行われ、眼球の十分な供給やホモ疾患サルの誕生にはあと5年の期間とサポートが必要であることが確認された。

E. 結論

黄斑変性カニクイザルの眼底検査が詳細に行われ、黄斑部を中心に黄白色斑点が疾患サルに共通して観察された。連鎖解析、候補遺伝子解析等によって疾患原因遺伝子が未知遺伝子である可能性が推測された。その他の実験については現在進行中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Connie Darmanin, Takeshi Iwata, Deborah A. Carper, Lindsay G. Sparrow, Roland P.-T. Chung, and Ossama El-Kabbani. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of human sorbitol dehydrogenase. *Acta Crystallographica* D59:558-560 (2003)

Shinsuke Umeda, Michihiro T. Suzuki, Yasuhiro Yoshikawa, Fumino Iwata, Keiko Fujiki, Atsushi Kanai, Naoko Sanuki, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Cloning

and Characterization of ELVL04 Gene in Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) Monkey. *Experimental Animal* 52:(2) 129-135 (2003)

Qiang Zhang, Yukihiro Mashima, Setsuko Noda, Yutaka Imamura, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Takatsune Nishiyama, Shinsuke Umeda, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Characterization of *AOC2* Gene Encoding a Copper-binding Amine Oxidase Expressed Specifically in Retina. *Gene* 318:45-53 (2003)

Kanako Izumi, Yukihiro Mashima, Minoru Obazawa, Yuichiro Ohtake, Tomihiko Tanino, Hiroshi Miyata, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Variants of Myocilin Gene in Japanese Patients With Normal Tension Glaucoma. *Ophthalmic Research* 35:345-350 (2003)

Yasuhiko Tanaka, Jun Utsumi, Mizuo Matsui, Tetsuo Sudo, Noriko Nakamura, Masato Mutoh, Akemi Kajita, Saburo Sone, Kazuteru Kigasawa, Masahiko Shibuya, Venkat N. Reddy, Qiang Zhang, and Takeshi Iwata. Purification, Molecular Cloning, and Expression of a Novel Growth Promotive Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:245-252 (2004)

Minoru Obazawa, Yukihiro Mashima, Naoko Sanuki, Setsuko Noda, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Comparable Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2004 in press)

2. 著書

岩田岳、真島行彦
インバーダー法を用いた緑内障の遺伝子解析
Bio Medical Quick Review Net 2004
記事番号4001
<http://www.medicaldo.co.jp/>
株式会社メディカル デウ

3. 学会発表

岩田岳、讃岐奈緒子、真島行彦、田中靖彦. 水晶発振子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. 日本眼科学会 2003年5月 (福岡)

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. 日本眼科学会 2003年5月 (福岡)

Iwata T, Sanuki N, Mashima Y, Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance (QCM) The Association of Research in Vision and Ophthalmology, May 2003, Fort Lauderdale Florida USA

Obazawa M, Sanuki N, Mashima Y, Noda S, Kudo J, Shimizu N, Tanaka Y, Iwata T. Expression of Porcine Myocilin and Optineurin in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head. The Association of Research in Vision and Ophthalmology, May 2003, Fort Lauderdale Florida USA

Iwata T, Zhang Q, Sergeev Y, Mashima Y, Noda S, Shimizu N, Tanaka Y. Characterization of Novel Amine Oxidase Specifically Expressed in Mouse Retinal Ganglion Cells. The American Society for Cell Biology, December 2003, San Francisco USA

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	岩田岳	Bio Medical Quick Review Net http://www.medicaldo.co.jp/	株式会社 メディカル デウ	東京	2003	—

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Connie Darmanin, Takeshi Iwata, Deborah A. Carper, Lindsay G. Sparrow, Roland P.-T. Chung, and Ossama El-Kabbani.	Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of human sorbitol dehydrogenase.	<i>Acta Crystallographica</i>	D59	558-560	2003
Shinsuke Umeda, Michihiro T. Suzuki, Yasuhiro Yoshikawa, Fumino Iwata, Keiko Fujiki, Atsushi Kanai, Naoko Sanuki, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata.	Cloning and Characterization of ELVL04 Gene in Cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>) Monkey.	<i>Experimental Animal</i>	52: (2)	129-135	2003
Qiang Zhang, Yukihiro Mashima, Setsuko Noda, Yutaka Imamura, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Takatsune Nishiyama, Shinsuke Umeda, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata.	Characterization of <i>AOC2</i> Gene Encoding a Copper-binding Amine Oxidase Expressed Specifically in Retina.	<i>Gene</i>	318	45-53	2003
Kanako Izumi, Yukihiro Mashima, Minoru Obazawa, Yuichiro Ohtake, Tomihiko Tanino, Hiroshi Miyata, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata.	Variants of Myocilin Gene in Japanese Patients With Normal Tension Glaucoma.	<i>Ophthalmic Research</i>	35	345-350	2003

Yasuhiko Tanaka, Jun Utsumi, Mizuo Matsui, Tetsuo Sudo, Noriko Nakamura, Masato Mutoh, Akemi Kajita, Saburo Sone, Kazuteru Kigasawa, Masahiko Shibuya, Venkat N. Reddy, Qiang Zhang, and Takeshi Iwata.	Purification, Molecular Cloning, and Expression of a Novel Growth Promotive Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2.	<i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i>	45	245-252	2004
Minoru Obazawa, Yukihiro Mashima, Naoko Sanuki, Setsuko Noda, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata.	Comparable Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head.	<i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i>		印刷中	2004

20030775

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。