

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—16年度 総合研究報告書

主任研究者 真島 行彦

平成17(2005)年 4月

研究報告書目次

目 次

I. 総合研究報告		
「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	-----	1-23
平成14年度 総括研究報告書		
平成15年度 総括研究報告書		
平成16年度 総括研究報告書		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	24-29
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	30-

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20%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20%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を構築し、918検体を解析し、今年度は緑内障発症・進行危険因子として、8遺伝子10遺伝子多型を同定した。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、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。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、緑内障治療薬としても期待できる。AT2 遺伝子 3123C>A 多型において、男性でAを持つ人はCを持つ人よりも眼圧下降効果が少なかった。正常眼圧緑内障の多くは人間ドック等偶然的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。

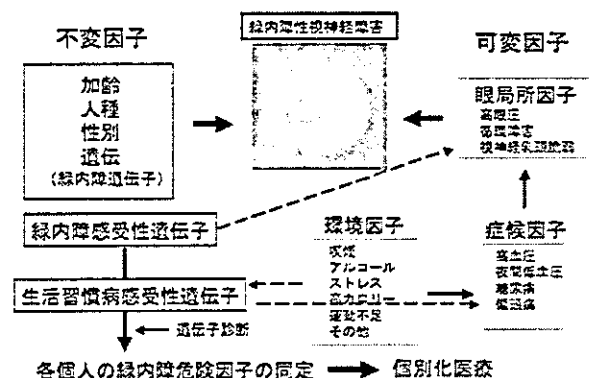
A. 研究目的

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。

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 association 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。

緑内障発症の危険因子



B. 研究方法

対象は、正常対照 300 例、NTG340 例、POAG278 例の合計 918 例である。

施設名	NTG	POAG	CONTROL	総合計	割合 (%)
慶応義塾大学	137	70	213	420	45.8
東北大学	64	67	60	191	20.8
東京聖隷病院	50	49	0	99	10.8
出田眼科	21	38	27	86	9.4
新潟大学	19	19	0	38	4.1
順天堂大学	22	8	0	30	3.3
浜松医科大学	15	9	0	24	2.6
熊本大学	9	9	0	18	2.0
広島大学	3	9	0	12	1.3
疾患別合計	340	278	300	918	100.0

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 15 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。80SNPs を解析する。対象は、正常対照 300 例、NTG340 例、POAG278 例の合計 918 例である。検索した緑内障感受性遺伝子多型は、①レニン・アンジオテンシン系、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。

PCR法による解析リスト (32 SNPs)

	遺伝子	多型
アポトーシス	TP53	Arg72Pro
アポトーシス	CD95	A-670G
酸化ストレス	SOD2	Val16Ala
外来物質代謝酵素	GSTT1	Positive/Null
外来物質代謝酵素	GSTM1	Positive/Null
外来物質代謝酵素	GSTP1	Ile105Val
酸化ストレス	p22phox	His72Tyr
酸化ストレス	NQO1	Pro187Ser
網膜神経節細胞特異的蛋白	AOC2	A-81G
接着分子	SELE	G98T
接着分子	SELE	Ser128Arg
サイトカイン	IL-1β	C-511T
サイトカイン	IL-1β	Phe105Phe(+3953C>T)
細胞外マトリックス	MMP9	C-1562T
受容体 (セロトニン)	HTR2A	Ser34Ser(102T>C)
ストレス蛋白	HSP70-1	190G>C
老化	WRN	Cys1367Arg
血管作動物質	NOS3	Glu298Asp
血管作動物質	NOS3	T-786C
血管作動物質 (レニン・アンジオテンシン系)	ACE	I8-83G>A
血管作動物質 (レニン・アンジオテンシン系)	ACE	INS/DEL
血管作動物質 (レニン・アンジオテンシン系)	ACE2	-1903A>G
受容体 (レニン・アンジオテンシン系)	AT1	1166A>C
受容体 (レニン・アンジオテンシン系)	AT1	-521C>T
受容体 (レニン・アンジオテンシン系)	AT1	-713T>G
受容体 (レニン・アンジオテンシン系)	AT2	3123C>A
血管作動物質 (レニン・アンジオテンシン系)	ACE2	-344C>A
サイトカイン	TNFα	-308G>A
サイトカイン	TNFα	-857G>A
サイトカイン	TNFα	-863G>A
受容体 (β1アドレナリン受容体)	ADRB1	Ser49Gly
受容体 (β1アドレナリン受容体)	ADRB1	Arg389Gly

インペーダー法による解析リスト (59 SNPs)

	遺伝子	多型
動脈硬化予防、高血圧症	APOE	C112R & C158R
動脈硬化予防	APOE	-219G>T
動脈硬化予防	APOE	-419A>T
動脈硬化	MTHFR	677C>T
動脈硬化	MTHFR	1298A>C
酸化ストレス	PON1	Leu54Met
酸化ストレス	PON1	Gln192Arg
酸化ストレス	PON2	C311S
血管作動物質 (血小板活性化因子)	PAF-AH	V279F
サイトカイン	LTA NcoI	C 252a>G
受容体 (TNF)	TNFRSF1A	
受容体 (TNF)	TNFRSF1B	
血管作動物質 (レニン・アンジオテンシン系)	ACE	M235T
血管作動物質 (レニン・アンジオテンシン系)	ACE	T174M
血管作動物質	HO-1	-413T>A
血管作動物質 (エンドセリン)	EDN1	Lys198Asn (G>T)(Exon 5)
血管作動物質 (エンドセリン)	EDN1	+138 A Ins/DeI (Exon 1)
血管作動物質 (エンドセリン)	EDN1	T4124C(orT8002C)(Intron)
血管作動物質 (エンドセリン)	EDN1	-1370T>G
受容体 (エンドセリン受容体A)	EDNRA	-231A>G (Exon 1)
受容体 (エンドセリン受容体A)	EDNRA	H323
受容体 (エンドセリン受容体A)	EDNRA	+70C>G
受容体 (エンドセリン受容体A)	EDNRA	+1222C>T
受容体 (エンドセリン受容体B)	EDNRB	Leu277Leu (G>A) (Exon 4)
血管作動物質	B2R	-58T>C
血管作動物質	B2R	R14C (181C>T) (Exon 2)
細胞外マトリックス	MMP3	5A/6A
細胞外マトリックス	MMP2	-1306C>T
細胞外マトリックス	MMP1	1G/2G

遺伝子	多型
細胞外マトリックス TIMP2	-418G>C
細胞外マトリックス TIMP2	+853G>A
受容体 (カンナビノ・CNR1)	Thr453Thr(1359G>A)
接着分子 SELE	1402C>T
接着分子 SELE	Leu554Phe
サイトカイン IL-1 α	-889C>T
サイトカイン IL-1 β	-31C>T
外来物質代謝酵素 EPHX1	Tyr113His(Exon3)
外来物質代謝酵素 EPHX1	Lys119Lys(G>A)(Exon3)
外来物質代謝酵素 GSTZ1	Lys32Glu
外来物質代謝酵素 GSTZ1	Arg42Gly
アポトーシス CD95	-1377G>A
アポトーシス p21/WAF-1	Ser31Arg
ストレス蛋白 HSP70-1	-110A>C
受容体 (セロトニン)HTR2C	Cys23Ser
サイトカイン TGF β 1	Leu10Pro
サイトカイン TGF β 1	-509C>T
線溶・凝固 PAI-1	4G/5G
線溶・凝固 Fibrinogen	-455G>A
接着分子 (インテグ GPIIa)	Leu33Pro
血管作動物質 (endoECE18C)	-338C>A
受容体 (β 2アドレ:ADRB2)	Arg16Gly
受容体 (β 2アドレ:ADRB2)	Gln27Glu
受容体 (β 2アドレ:ADRB2)	Thr164Ile
高脂血症 (コレステリ CETP)	Taq1B
高脂血症 (リポ蛋白 LPL)	S447X
高脂血症 (肝性トリ:HTGL)	-514T>C
高脂血症 (酸化LDL \downarrow :CD36)	-178A>C
緑内障遺伝子? Oculomedin	Gly30Val, Leu34Pro
外来物質代謝酵素 CYP1A1	T6235C, A4889G

4) アンジオテンシン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) 新規緑内障感受性遺伝子の同定

ある染色体において、SNPsを用いた Case-control association study により感受性領域を、企業に委託し、解析した。

6) 正常眼圧緑内障患者の発見動機の詳細

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。

倫理面への配慮：平成13年3月に3省共同告示された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の概要を元に、説明書と同意書を作成した。遺伝子解析を行うにあたり、慶應義塾大学医学部の倫理委員会で承認されている。実際に以下の内容に沿って患者に説明し、同意を得た後文書により署名する。

(1) 研究協力の任意性と撤回の自由（患者およびその親族等のプライバシーを守る。同意はいつでも撤回でき、その場合、不利益を受けないことを保証する。）(2) 調べる遺伝子は病気の原因と関連あるものに限定する。(3) 試料提供者の利益および不利益 (4) 個人情報の保護（研究協力者の氏名を削除し、無名化する。）検体は符号化され、符号と患者を結びつける対応表は、眼科学教室で厳重に管理されている。外部で試料を解析する場合には、符号化された検体が渡される。ヒト試料のデータ管理体制は、試料自体は研究室の冷蔵庫で管理されるが、現在の研究室は、登録した研究者だけが研究室内に入れるシステムとなっている。解析されたデータはコンピューターに入力されるが、コンピューターは外部とは物理的に遮断されている。

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298名中6名(2%)に検出された。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ダ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。MYOCおよびOPTN変異を検出するシステムを構築した。

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・アンジオテンシン系では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CD95に有意差があった。④動脈硬化関連ではPON1に有意差があった。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接着分子関連では有意差のある多型は無かった。⑪OPTN遺伝子において開放隅角緑内障および正常眼圧緑内障患者の両者と有意に関連する新たな多型を検出した。

4) アンジオテンシン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。AT2遺伝子3123C>A多型において、男性でAを持つ人はCを持つ人よりも眼圧下降効果が少なかった (表1)。

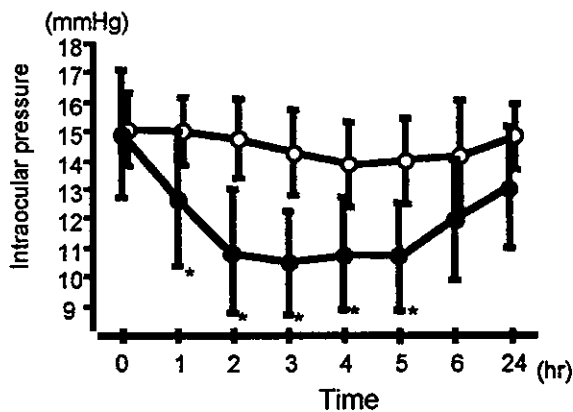


表1 Effects of angiotensin II receptor blocker on intraocular pressure in association with genotypes of the angiotensin II receptor genes

Polymorphisms	Genotype	Number (eyes)	Maximum reduction of IOP (mmHg)	P*
AGTR1 -713T>G	TT	18	4.9 ± 1.8	P=0.898
	TG	2	5.0 ± 4.2	
	GG	0	0	
AGTR1 -521C>T	CC	18	4.9 ± 1.8	P†=0.117
	CT	1	2	
	TT	1	8	
AGTR1 1166A>C	AA	18	5.1 ± 2.0	P=0.405
	AC	2	5.2 ± 1.6	
	CC	0	0	
AGTR2 3123C>A	C (male)	9	5.0 ± 1.1	P=0.014 ‡
	A (male)	4	2.3 ± 0.5	
	CC (female)	3	7.0 ± 1.0	P=0.354
	CA (female)	4	6.0 ± 1.6	
	AA (female)	0	0	

* P value for Mann-Whitney U test
† P value for Kruskal-Wallis test
‡ P < 0.05

5) 新規緑内障感受性遺伝子の同定

2番染色体において、SNP検索により統計学的にP値が0.01以下の領域が同定された。

6) 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%と低いが、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。この結果は欧米の報告と一致する。また、変異の多くはエキソン4, 5に集中しているため、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2%で、欧米より低かった。この結果は、日本人においては正常眼圧緑内障が多いことに関連する。

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、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

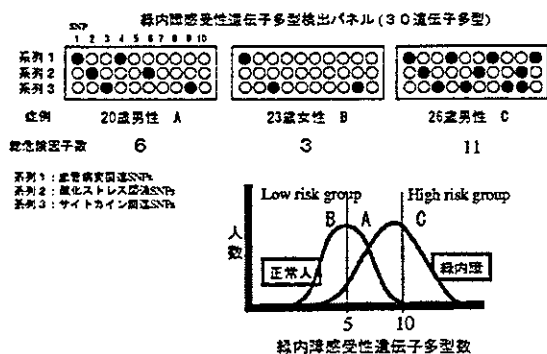
緑内障の発症、進行に関連する感受性遺伝

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。

今回の検討では、85遺伝子92遺伝子多型を検討し、9遺伝子10多型が緑内障と有意に危険因子として関連していた。種々の緑内障発症の危険因子を遺伝子多型で明らかにすることで、各個人における危険因子を明らかにすることが可能となる。今後は各個人に応じた危険因子を除去することにより、予防法がより効果的に行われる可能性がある。将来行われであろう個別化医療へ向けてのデータの蓄積が重要と思われ、今後も緑内障感受性遺伝子多型の同定を行う必要がある。

今後は、緑内障発症または進行に関するリスク診断を行う感受性遺伝子多型検出パネルの作成を目指している。たとえば、ある人が危険因子を持っているとして、数が多ければそれだけ発症や進行のリスクが高くなることが考えられる。図1は予想図であるが、持っている数によりその危険度は異なるため、将来的には多数症例を検討することにより、リスクの高い範囲を決定できると考えられる。

図1「



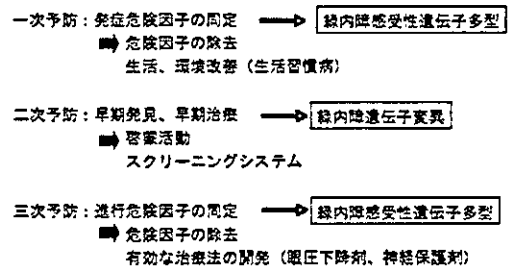
しかしながら、緑内障発症や進行の危険度は危険因子の数だけの問題ではなく、その質（または種類）にも寄るので、危険因子の質

にもリスク度の順番を決定して行くことが重要と考える。

図2は第107回日本眼科学会総会の特別講演で塚原重雄名誉教授が述べられている「21世紀の緑内障診療の現状と未来」を参考にゲノム医療における緑内障による失明予防戦略を作成したものである。

一次予防として、緑内障の発症に関連する危険因子が同定できれば、その因子を除去することにより発症を抑えるか、発症を遅くすることが可能となる。

図2



最近、スタチン (HMG-CoA還元酵素阻害剤) や他のコレステロールを下げる内服薬を長期に使用することにより緑内障発症の危険を下げる事が報告された。特に、コレステロールが高い人ではより有効であった。スタチンはコレステロールを低下させるだけでなく、血管保護作用 (血管内皮のNO合成酵素の発現増加やAT1受容体作用の抑制) が報告されている。各個人における危険因子を診断することができれば、それに応じた治療が行われる (個別化医療)。二次予防としては、早期発見、早期治療であるが、緑内障の患者はその20%が医療機関を受診しているに過ぎないことから、積極的な啓蒙活動を行うことが重要と思われる。家族歴は高い危険因子なので、家系内に緑内障を発症している人は、緑内障遺伝子診断を行うことで、発症前にその確定診断を受けることができ、早期治療が可能となる。

三次予防としては、緑内障を発症した患者の進行を遅らせることであるが、各個人にお

いて、進行の危険因子が分かれば、それに
応じた治療が行われる。たとえば、エンドセリンは緑内障との関連が示唆されているが、エンドセリン関連の感受性遺伝子多型が悪化に関連するとすれば、その危険因子を持った患者はエンドセリンを抑える薬剤の投与が有効である可能性がある。

21世紀のゲノム医療の時代における遺伝子診断の意義は、多因子疾患におけるリスク診断である。緑内障感受性遺伝子多型の検索は、各個人のゲノムの多様性、すなわち緑内障になり易い体質の差や進行し易い体質の差を検出することになり、その情報は個別化医療にむけて発症の危険性や予防、予後予測、および将来的には薬剤等の治療法の選択および新しい治療薬の開発につながることを期待される。

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

AT2遺伝子3123C>A多型において、男性でAを持つ人はCを持つ人よりも眼圧下降効果が少なかった。今後、新たな緑内障治療薬として期待できると同時に、今回明らかにしたSNPに関しては多数症例で検討を要する。

5) 新規緑内障感受性遺伝子の同定

今後は2次スクリーニングを行う。

6) 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918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。今後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、新たな緑内障遺伝子の可能性のあるノエリン2や、2番染色体に存在する遺伝子の存在を明らかにしたことは意義がある。

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

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 55:202-205, 2004

真島行彦：緑内障遺伝子 緑内障セミナー あたらしい眼科 21(11):1493-1494, 2004.

真島行彦：代替医療品による緑内障治療 アンギオテンシン II 受容体拮抗薬。Frontiers in Glaucoma 5(4):52-53, 2004.

真島行彦：個別化医療の時代にむけての遺伝子診断。宿題報告 眼科検査診断法 日本眼科学会雑誌 108(12):863-886, 2004.

相馬久実子、大竹雄一郎、石川果林、木村至、谷野富彦、真島行彦、小口芳久。広義の開放隅角緑内障の受診機転および家族歴。あたらしい眼科 2005 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

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.

Obazawa M, Mashima Y, Sanuki N, Noda S, Kudoh J, Shimizu N, Oguchi Y, Tanaka Y, Iwata T. Analysis of porcine optineurin and myocilin expression in trabecular meshwork cells and astrocytes from optic nerve head. Invest Ophthalmol Vis Sci 45(8):2652-2659, 2004.

Ishikawa K, Funayama T, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Suzuki K, Ideta H, Fujimaki T, Tanihara H, Asaoka R, Naoi N, Yasuda N, Iwata T, Mashima Y. Novel MYOC gene mutation, Phe369Leu, in Japanese patients with

denaturing high-performance liquid chromatography. J Glaucoma 2004 Dec;13(6):466-471.

Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, Suzuki K, Ideta H, Nakemoto K, Yasuda N, Fujimaki T, Murakami A, Asaoka R, Hotta Y, Tanihara H, Kanemoto T, Mishima H, Fukuchi T, Abe H, Iwata T, Shimada N, Jun Kudoh, Shimizu N, Mashima Y. Variants in Optineurin Gene and their Association with Tumor Necrosis Factor- α Polymorphisms in Japanese Patients with Glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004 Dec;45(12):4359-4367.

Ishikawa K, Funayama T, Ohde H, Ocushi Y, Mashima Y. Polymorphic Variants of genes associated with apoptosis and oxidative stress in Leber's hereditary optic neuropathy. Jpn J Ophthalmol 2005;49:121-126.

Kouhei Hashizume, Tomoyo Fumayama, Yuichiro Ohtake, Itaru Kimura, Kazuhide Yoshida, Karin Ishikawa, Koichi Miyaki, Yukihiko Mashima; for The Glaucoma Gene Research Group. Genetic Polymorphisms in Angiotensin II Receptor Gene and Their Association with Open-angle Glaucoma in Japanese Population. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005 in press

2. 学会発表

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）

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

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4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のヘテロプラスミ定量法 第10回日本遺伝子診療学会大会 平成15年7月

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）

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

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

真島行彦：宿題報告「眼科検査診断法」—個別化医療の時代にむけての遺伝子診断— 第108回日本眼科学会総会 平成16年4月17日（東京）

石川果林、船山智代、大出尚郎、小口芳久、真島行彦：レーベル遺伝性視神経症（レーベル病）における臨床型と遺伝子多型の検討 第108回日本眼科学会総会 平成16年4月

船山智代、真島行彦、石川果林、大竹雄一郎、谷野富彦、木村至、黒坂大次郎、小口芳久、緑内障遺伝子解析研究会：日本人緑内障患者における Optinurine (OPTN)、Myociline (MYOC) 遺伝子解析 第108回日本眼科学会総会 2004年4月

稲垣陽子、船山智代、石川果林、大竹雄一郎、木村至、真島行彦、緑内障遺伝子解析研究会：Paraoxonase の遺伝子多型と緑内障との関連について。第15回日本緑内障学会 2004年9月

石川果林、船山智代、稲垣陽子、木村 至、大竹雄一郎、黒坂大次郎、真島行彦：緑内障とエンドセリン-1 およびエンドセリン受容体遺伝子多型。第15回日本緑内障学会 2004年9月

田邊佐智子、木村 至、谷野富彦、大竹雄一郎、石川果林、宮島有穂、真島行彦：正常人におけるカンデサルタンシレキセチル内服による眼圧下降効果。第15回日本緑内障学会 2004年9月

石川果林、船山智代、吉田和秀、木村至、大竹雄一郎、谷野富彦、黒坂大次郎、真島行彦、緑内障遺伝子解析研究会：緑内障とアポトーシスおよび酸化ストレスに関する遺伝子多型の検討。第109回日本眼科学会総会 平成17年3月25日（東京）

船山智代、石川果林、吉田和秀、木村至、大竹雄一郎、谷野富彦、黒坂大次郎、真島行彦、緑内障遺伝子解析研究会：緑内障患者における Fas(APO-1/CD95) プロモーター多型と Optineurin (OPTN) との関連。第109回日本眼科学会総会 平成17年3月25日（東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 申請中
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究者名

工藤 純（慶應義塾大学医学部分子生物）
大竹雄一郎（慶應義塾大学医学部眼科）
岩田 岳（感覚器センター仮称）
堀田 喜裕（浜松医科大学眼科）
谷原 秀信（熊本大学医学部眼科）
布施昇男（東北大学大学院医学系・眼科）

研究協力者

船山 智代	慶應義塾大学医学部
谷野 富彦	慶應義塾大学医学部
橋爪 公平	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
鈴木浩太郎	慶應義塾大学医学部
佐藤 裕理	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
兼田英子	慶應義塾大学医学部
吉田和秀	慶應義塾大学医学部

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20%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20%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 (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。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・アンジオテンシン系ではアンジオテンシン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
出石眼科	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ー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、反応チャンバ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P450 1B1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、レー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。ピ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

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の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・アンジオテンシン系、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) アンジオテンシン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変異の探索

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ダ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ダ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・アンジオテンシン系では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) アンジオテンシン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%と低いが、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。またその多くはエクソン4, 5に集中しているため、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、今年度はまず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ため、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、