

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15－17年度 総合研究報告書

平成18年3月

主任研究者 岩田 岳

I. 班員構成

若年性黄斑変性カニクイザルの病理学的及び分子生物学的解析

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
主任研究者	岩田 岳	国立病院機構東京医療センター臨床研究センター	室 長
分担研究者	寺尾 恵治 吉川 泰弘 溝田 淳 野田 徹 西村 俊秀	筑波霊長類センター 東京大学大学院農学生命科学研究科 順天堂大学浦安病院眼科 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター 東京医科大学臨床プロテオームセンター	センター長 教 授 助教授 部 長 教 授
事務局	赤堀 正和 皆見 政好 福田 美穂	国立病院機構東京医療センター臨床研究センター 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター 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 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL/FAX (03)3411-1026	研究員 研究員 秘 書
経理事務担当	谷本 和則	独立行政法人国立病院機構東京医療センター事務部 庶務課 TEL 03-3411-0111 FAX 03-3412-9811 ktanimot@ntmc.hosp.go.jp	係 長

II. 総合研究報告

総合研究報告書

主任研究者	岩田 岳	東京医療センター臨床研究センター 室長
分担研究者	野田 徹	東京医療センター臨床研究センター 部長
分担研究者	寺尾 恵治	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター センター長
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	順天堂大学浦安病院眼科 助教授
分担研究者	西村 俊秀	東京医科大学臨床プロテオームセンター 教授

研究要旨：本研究は世界で唯一の加齢黄斑変性の霊長類モデルを使った研究である。ドルーゼンの組成、自己抗体の発見、原因遺伝子の解析など、疾患の発症機序の解明に深く関わる情報がこの研究によって明らかとなった。この情報は疾患末期の血管新生より前の段階での診断や予防法の確立を可能とする。今後我々はこの研究を継続し、この霊長類モデルを用いて創薬の開発を開始する。

キーワード： カニクイザル、加齢黄斑変性、連鎖解析、プロテオーム解析、自己免疫疾患

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、光を感じる視細胞が最も密に集中する。ここは視力を決定する重要な部位であり、障害されると著しい視力低下、ひいては失明に至る。代表的な疾患として難治性疾患、加齢黄斑変性がある。加齢黄斑変性は米国では65歳以上で失明率が最も高い眼疾患であるが、日本でも急速な高齢化と生活の欧米化によって患者数は急増しており、その原因解明と予防・治療法の開発が急がれている。

黄斑は高解像度の視力を獲得した霊長類でのみ発達し、通常の実験に使用されるマウスやラットなどの夜行性ゲツ菌類には存在しない。根本的な予防法や治療法が確立できない理由の1つとして、黄斑のある疾患動物が存在しなかったことが原因と考えられる。(独) 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで発見された黄斑変性カニクイザルは生後2年でドルーゼンを発症する世界で唯一の動物モデルである。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はその1/25の時間で観察される。また、ヒトと類似する加齢性黄斑変性カニクイザルの解析と平行して加齢黄斑変性の診断や治療は主に病気の末期に観察される血管新生に的が絞られており、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。本研究ではこのモデル動物の詳細な解析により、原因の解明とこれまでの血管新生より早い時期における治療法の方向性を確立することを目的に行った。

細な解析により、原因の解明とこれまでの血管新生より早い時期における治療法の方向性を確立することを目的に行った。

B. 研究方法

(1) 疾患サルの繁殖

本疾患が常染色体上の優性遺伝形質で発現することから、疾患個体を種雄とする交配により新たな疾患個体を効率的に生産し、新規治療法の実験に必要な個体数の確保を行った。

(2) 疾患サルの眼底検査

一般的な身体検査に加え、眼底観察、網膜電図、蛍光眼底撮影、蛍光眼底造影を行った。全個体から採血し、連鎖解析に必要なDNAの確保を行った。

(3) 若年黄斑変性カニクイザルのデータベースの構築

眼底観察、網膜電図、蛍光眼底撮影、蛍光眼底造影など、これまでの観察結果(テキスト、画像)をデータベース化し、個体別の情報検索がインターネット上からできるようにした。分担研究者が300百頭以上のサルについて最新情報を検索することができる

(http://monkey.kankakuki.go.jp/fmi/iwp/res/iwp_home.html)。

(4) 疾患サルの病理学的解析

若年性及び加齢性黄斑変性カニクイザルの眼球を摘出し、網膜切片についてHE染色、補体関連分子、酸化マーカー等の免疫染色、ドルーゼンの電子顕微鏡観察を行った。また、マイクロダイセクション法を用いて黄斑部を切り取り、その抽出液に対するウエスタンブロットによってタンパク質の発現解析を行った。

(5) ドルーゼンのプロテオーム解析

黄斑変性カニクイザルの特徴である、ドルーゼンの組成を調べ、ヒトのドルーゼンとの比較を行った。疾患眼球の硝子体、網膜、網膜色素上皮細胞を順次に剥がし、ブルッフ膜上に点在するドルーゼンをマニピレーターに接続した極細ガラス管を使ってドルーゼンを吸引し、トリプシン消化した後、逆走クロマトグラフィーによって分離し、イオントラップ型質量分析計を用いてタンパク質の同定を行った。2種類のタンパク質検索ソフトを用いてNCBIのデータベースを検索した。

(6) 黄斑部と網膜周辺部のプロテオーム解析

黄斑部は霊長類に特徴的な網膜上の部位であり、黄斑部におけるタンパク質の発現は疾患と密接に関係している。黄斑部と周辺網膜のプロテオーム解析を行い、発現タンパク質の比較を行った。40眼の黄斑部と周辺部については直径6mmのパンチホールを網膜から脈絡膜層まで切り取り、これらをプールして二次元電気泳動によって分画し、220個のスポットを切り出して同定を試みた。

(7) 候補遺伝子の遺伝子解析

これまでにヒト若年性黄斑変性の原因遺伝子として報告されている遺伝子(ELOVL4, TIMP, ABCA4, RDS, VMD2, EFEMP1)についてサルの遺伝子をクローニングし、疾患と健常個体について遺伝子解析を行った。特にEFEMP1遺伝子はDominant Drusen症の原因遺伝子として、疾患サルの原因遺伝子として期待された。

(8) 若年性黄斑変性カニクイザルの連鎖解析

カニクイザルはヒトゲノムと95%以上の相同性をもつことから、ヒト用連鎖解析マーカー(ABI, linkage marker set)を用いて、DNAシーケンサー(ABI 3100)による連鎖解析をゲノム全体について行った。特にELOVL4, TIMP,

ABCA4, RDS, VMD2, EFEMP1などのローカスについては連鎖の可能性があるために、候補遺伝子解析と平行して、詳細に行われた。

(9) 加齢黄斑変性カニクイザルの自己免疫抗原体の解明

カニクイザルの網膜抽出液、網膜色素上皮細胞抽出液をゲルに展開し、加齢性黄斑変性カニクイザルの血清中を使ってウエスタンブロットを行った。抗原タンパク質はクローニングした後にHisタグを付けて大腸菌で発現し、ニッケルアフィニティーカラムによって精製した。精製タンパク質を96穴ニッケルプレートの底に固定し、ELISAを行った。

(10) 加齢黄斑変性患者の血液検体の収集と自己免疫抗体の探索、質量分析計による血漿解析による疾患マーカーの検索

東京医療センター倫理委員会、順天堂大学浦安病院倫理委員会の承認を得て、加齢黄斑変性患者の血清に含まれる、自己免疫抗体の探索を行った。ヒト網膜・脈絡膜層の抽出液はカナダの研究室から提供されたものを用いた。滲出型加齢黄斑変性患者と健常者との血漿についてトリプシン処理の後、2次元液体クロマトグラフィーによる分画、イオントラップ型質量分析計を用いて解析を行った。生データはタンパク質検索ソフトを用いてNCBIの最新データベースを検索し、比較を行った。

D. 考察

(1) 疾患サルの繁殖

若年性黄斑変性を発症している雄ザルを種親として39頭の雌ザルと交配し、9頭の新生児を得た。黄斑変性と診断された雌雄を交配し、疾患遺伝子のホモ個体の作出を試みた。17年未の維持頭数は疾患個体29頭、未判定個体11頭の計40頭である。疾患は常染色体優勢遺伝しており、単一遺伝子の変異に疾患と予測される。

(2) 疾患サルの眼底検査

眼底観察、網膜電図、蛍光眼底撮影、蛍光眼底造影などの結果、若年性黄斑変性カニクイザルは生後1年から2年で黄斑部からドルーゼンが現れ、加齢とともに周辺部もドルーゼンで覆われる(Umeda, Iwata et al, IOVS 2005)。最高17歳の疾患サルを観察しているが、血管

新生はまだ観察されていない。

(3) 若年黄斑変性カニクイザルのデータベースの構築

分担研究者が疾患サルの解析情報を把握するために、眼底検査結果や遺伝子解析結果をデータベース化し、インターネットからIDとPWによってログインして検索できるシステムを構築した。国内外の複数の大学や製薬企業から加齢黄斑変性治療薬の開発のためにこの霊長類モデルを利用したいとの依頼がきており、繁殖能力の低い疾患サルの効率的な治験管理が重要になってきた。今後は治療薬投与後の経過が記録できるようにシステムに改良していく予定である。

(4) 疾患サルの病理学的解析

若年性黄斑変性カニクイザルのドルーゼンは生後間もなく現れるが、その組成については免疫染色の結果、加齢性黄斑変性カニクイザルやヒト加齢黄斑変性のドルーゼンと同じ組成であることが明らかとなり、補体因子活性化因子(apolipoprotein E, amyloid P component)、補体因子 (complement component C5, the terminal C5b-9 complement complex)、補体抑制因子 (vitronectin) やmembrane cofactor proteinなどのタンパク質が同定された。加齢黄斑変性の初期の病態が生後2年で現れることが免疫染色によっても証明された。

(5) ドルーゼンのプロテオーム解析

ドルーゼンをプルッフ膜上から吸引し、その組成を直接解析した結果、60種類のタンパク質の同定に成功した(Umeda, Iwata et al, FASEB J 2005)。免疫染色の結果と合わせてドルーゼンの生成過程が明らかになってきた。補体活性化因子、補体因子、補体抑制因子など補体活性化経路の古典経路及び2次経路の活性化が確認された。網膜下において局所的な炎症反応が拡大することによって、加齢黄斑変性が発症していると考えられ、進行すれば血管新生に至る可能性がある。霊長類のドルーゼンで補体活性化が確認されたのはこれが最初であり、疾患モデル動物として確立することができた。

(6) 黄斑部と網膜周辺部のプロテオーム解析

黄斑部と周辺部の抽出液を2次元電気泳動によって分画し、それぞれについて220個の

スポットを同定した結果、arrestin 3など錐体細胞が黄斑部に集中していることから検出されるタンパク質やミトコンドリア由来のタンパク質、そして α -synucleinなど特徴的なプロファイルが明らかとなった(論文投稿中)。

(7) 候補遺伝子の遺伝子解析

ヒトの若年性黄斑変性の原因遺伝子として報告されている遺伝子群 (ELOVL4, TIMP, ABCA4, RDS, VMD2, EFEMP1) についてサルの遺伝子をクローニングして遺伝子解析を行った結果、何れの遺伝子についても疾患と連鎖する遺伝子変異あるいは遺伝子多型は検出できなかった。特にDominant Drusen症の原因遺伝子のEFEMP1に変異が存在しなかったことにより、原因遺伝子は未知遺伝子である可能性が高い(Umeda, Iwata et al, IOVS 2005)。

(8) 若年性黄斑変性カニクイザルの連鎖解析

ヒト若年性黄斑変性の原因遺伝子であるELOVL4, TIMP, ABCA4, RDS, VMD2, EFEMP1のローカスを含むゲノムワイドに連鎖解析を行った結果、染色体6qに位置するマーカーと連鎖することがわかった(Umeda, Iwata et al, IOVS 2005)。この領域にはCONE DYSTROPHY 3やINTERPHOTORECEPTOR MATRIX PROTEOGLYCAN 1など眼疾患遺伝子が存在し、これらと疾患との関係を現在解析中である。

(9) 加齢黄斑変性カニクイザルの自己免疫抗原体の解明

加齢性黄斑変性カニクイザルの血清中に含まれる自己免疫抗体の検索を行った結果、網膜に含まれる2種類のタンパク質について自己免疫抗体が存在することが明らかとなった。このタンパク質はアネキシンI I Aとミュクリスタリンである。このタンパク質を大腸菌で発現・精製し、ELISAによって個体別に抗体量を比較した結果、抗体量の増加が疾患個体に優位な結果が得られた(Umeda, Iwata et al, FASEB J 2005)。アネキシンI I A分子を解析した結果、この分子は網膜色素上皮細胞上に発現するタンパク質をコードしており、このタンパク質に対する自己抗体によって細胞の機能障害が起こり、ドルーゼンが蓄積する可能性がでてきた。

(10) 加齢黄斑変性患者の血液検体の収集と

自己免疫抗体探索、質量分析計による血漿解析による疾患マーカーの検索

疾患サル自己免疫抗体の検索に加え、加齢黄斑変性患者と正常者の血漿プロテオームの比較を開始したが、アルブミンや免疫グロブリン分子などの多量タンパク質が妨害して少量分子の検出がこれまでできなかった。これらの多量分子を除くためのアフィニティーカラムなどを複数検討し、またサンプルの前処理の検討を行った結果、1000-1500のタンパク質の同定が可能なシステムを構築中である。今後解析条件を整えば、疾患と正常のサル、ヒトの血漿解析を行い、比較検討を行う。

E. 結論

本研究によって世界で唯一の霊長類黄斑変性モデルとして確立することができた。特に早期における治療法も含めた予防・治療薬の開発には大きな貢献が期待される。疾患個体数がまだ十分とは言えないが、効率的な疾患個体の運用によって多くの薬剤に対する評価ができるようなシステムを確立したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文

J. Fielding Hejtmancik, Marc Kantorow, and Takeshi Iwata. Models of Age Related Vision Problems, Handbook of Models for Human Aging. 812-828 Academic Press, USA 2006

Umeda S, Suzuki MT, Okamoto H, Ono F, Mizota A, Terao K, Yoshikawa Y, Tanaka Y, and Iwata T. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J* 19:1683-1685 (2005)

Umeda S, Ayyagari R, Allikmets R, Suzuki MT, Karoukis AJ, Ambasudhan R, Zernant J, Okamoto H, Ono F, Terao K, Atsushi M, Yoshikawa Y, Tanaka Y, and Iwata T. Early onset macular degeneration with drusen in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)

pedigree caused by a novel gene mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:683-691 (2005)

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) (2003)

Suzuki MT, Terao K, Yoshikawa Y. Familial early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primates*. 2003 Jul;44(3):291-4. Epub 2003 Mar 14.

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)

Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K and Terao K. Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with human newborn-equivalent body weights. *Exp Anim.*, 2005, 54:421-428.

Takano JI, Narita T, Tachibana H, Shimizu T, Komatsubara H, Terao K, Fujimoto K. Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infections in cynomolgus monkeys imported into Japan for research. *Parasitol Res*. 2005, 97: 255-257.

Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys.

- Immunogenetics. 2005, 57:189-197.
- Hara M, Kikuchi T, Ono F, Takano J, Ageyama N, Fujimoto K, Terao K, Baba T, Mukai R. Survey of Captive Cynomolgus Macaque Colonies for SRV/D Infection Using Polymerase Chain Reaction Assays. *Comp Med.* 2005, 55:145-149.
- Kimura N, Yanagisawa K, Terao K, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Age-related changes of intracellular Abeta in cynomolgus monkey brains. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005, 31:170-180.
- Okada H, Ito M, Hirose Y, Uda A, Terao K, Yoshida T, Sankai T. Buffalo Rat Liver Cells Produce Factors that Support Preimplantation Development of Mouse Embryos Cultured In Vitro. *Comp Med.* 2005, 55:61-66.
- Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono Y. Repair of Infarcted Myocardium Mediated by Transplanted Bone Marrow-Derived CD34+ Stem Cells in a Nonhuman Primate Model. *Stem Cells.* 2005, 23:355-364.
- Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, Ageyama N, Ueda Y, Ogata S, Tabata T, Nagashima T, Takatoku M, Kume A, Ikehara S, Taniwaki M, Terao K, Hasegawa M, Ozawa K. High-level in vivo gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow conditioning in nonhuman primates. *Mol Ther.* 2004, 10: 469-477.
- Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lemere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J Neurosci.* 2004, 24: 4894-4902.
- Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A. Detection of CD3epsilon polymorphism in cynomolgus monkeys by a method based on RFLP. *J Med Primatol.* 2004, 33: 34-37.
- Mimuro J, Mizukami H, Ono F, Madoiwa S, Terao K, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y. Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. *J Thromb Haemost.* 2004, 2: 275-280.
- Asano T, Hanazono Y, Sasaki K, Ueda Y, Hasegawa M, Ageyama N, Terao K, Kitano Y, Momoeda M, Ozawa K, Harii K. Allogeneic transplantation of genetically modified primate embryonic stem cells. *Wound Repair Regen.* 2004, 12: A16.
- Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M. In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J Gene Med.* 2004, 6: 22-31.
- Lee WW, Nam KH, Terao K, Yoshikawa Y. Possible role of genetic factor(s) on age-related increase of peripheral CD4+CD8+ double positive T cells in cynomolgus monkeys. *Exp Anim.* 2003, 52:309-316.
- Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y. Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation.* 2003, 76:1061-1067.
- Watanabe K, Watanabe R, Shioda A, Mizoguchi K, Sugimoto T, Terao K. Investigation of the mechanism of drug-induced autoimmune hemolytic anemia in cynomolgus monkeys elicited by a repeated-dose of a humanized monoclonal antibody drug.

- J Toxicol Sci. 2003, 28:123-138.
- Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, Terao K. Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am J Primatol.* 2003, 61:3-12.
- Kirii Y, Inoue T, Yoshino K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K. Molecular cloning, functional characterization, and enzyme-linked immunosorbent assay of cynomolgus monkey Fas ligand. *J Immunol Methods.* 2003, 278:201-209.
- Negishi T, Shimomura H, Koyama T, Kawasaki K, Ishii Y, Kyuwa S, Yasuda M, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects social behaviors between developing rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Toxicol Lett.* 2006 Jan 25;160(3):233-244. Epub 2005 Aug 25.
- Bak EJ, Ishii Y, Omatsu T, Kyuwa S, Hayasaka I, Yoshikawa Y. Sequence analysis of the MHC class II DPB1 gene in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Int J Immunogenet.* 2005 Jun;32(3):187-92.
- Akahori M, Takatori A, Kawamura S, Itagaki S, Yoshikawa Y. No regional differences of cytochrome P450 expression in the liver of Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Exp Anim.* 2005 Apr;54(2):131-6.
- Yoshimoto N, Shimoda K, Mori Y, Honda R, Okamura H, Ide Y, Nakashima T, Nakagata N, Torii R, Yoshikawa Y, Hayasaka I. Ovarian follicular development stimulated by leuprorelin acetate plus human menopausal gonadotropin in chimpanzees. *J Med Primatol.* 2005 Apr;34(2):73-85.
- Sekiguchi S, Takatori A, Negishi T, Kwon J, Kokubo T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Localization of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1 in cynomolgus monkey placentas. *Placenta.* 2005 Jan;26(1):99-103.
- Negishi T, Tominaga T, Ishii Y, Kyuwa S, Hayasaka I, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (*Macaca fascicularis*), and chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Exp Anim.* 2004 Jul;53(4):391-4.
- Kimura N, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Astroglial responses against Abeta initially occur in cerebral primary cortical cultures: species differences between rat and cynomolgus monkey. *Neurosci Res.* 2004 Jul;49(3):339-46.
- Kimura N, Nakamura S, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Presenilin-2 in the cynomolgus monkey brain: investigation of age-related changes. *Primates.* 2004 Jul;45(3):167-75. Epub 2004 Feb 18.
- Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Primary culture of cortical neurons, type-1 astrocytes, and microglial cells from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) fetuses. *J Neurosci Methods.* 2003 Dec 30;131(1-2):133-40.
- Michishita M, Nakamura S, Sakakibara I, Ono F, Fujimoto K, Kamiya K, Ishii Y, Hayashi K, Yoshikawa Y, Takahashi K. Spontaneous T-cell-rich B-cell lymphoma in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Exp Anim.* 2003 Jul;52(4):339-44.
- Kimura N, Tanemura K, Nakamura S, Takashima A, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y.

Age-related changes of Alzheimer's disease-associated proteins in cynomolgus monkey brains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 17;310(2):303-11.

Chen Y, Ogawa H, Narita H, Ohtoh K, Yoshida T, Yoshikawa Y. Ratio of leptin to adiponectin as an obesity index of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Exp Anim.* 2003 Apr;52(2):137-43.

Igarashi Y, Sato E, Ito A, Miyauchi O, Ikejiri M, Hanawa T, Mizota A, Fujimoto N, Adachi-Usami E: Yatabe-Guilford personality test in patient with retinitis pigmentosa. *Jpn J Ophthalmol* 47: 1-5, 2003

Kondo H, Tahira T, Mizota A, Adachi-Usami E, Oshima K, Hayasaka K: Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa by Linkage-Based Exclusion Screening with Multiple Locus-Specific Microsatellite Markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1275-1281, 2003

Inoue-Matsushita E, Sogo S, Mizota A, Tani ai M, Takenaka H, Mano T: Effect of MCI-9042, a 5-HT₂ receptor antagonist, on retinal ganglion cell death and retinal ischemia. *Exp Eye Res* 76: 445-452, 2003.

Hoshino A, Mizota A, Adachi-Usami E: Ciliary Body Metastasis from Colon Adenocarcinoma. *Ann Ophthalmol* 35, 73-75, 2003.

Kitahashi M, Mizota A, Adachi-Usami E: Subperiosteal hematoma secondary to ethmoid sinusitis. *Ann Ophthalmol* 35, 130-132, 2003

Mizota A, Niimura M, Adachi-Usami E: Clinical Characteristics of Japanese Children with optic neuritis. *Pediatr Neurol* 31, 42-45, 2004

Koyama M, Mizota A, Igarashi Y, Adachi-Usami E: Seventeen cases of central serous chorioretinopathy associated with systemic

corticosteroid therapy. *Ophthalmologica* 218: 107-110, 2004

Mizota A, Hoshino A, Adachi-Usami E, Fujimoto N: Binocular summation in visual evoked cortical potentials who have significantly different P100 peak latencies in their two eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2004 Sep;242(9):762-6

Kondo H, Qin M, Mizota A, Kondo M, Hayashi H, Hayashi K, Oshima K, Tahira T, Hayashi, K: Homozygosity-based search for mutations in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa using microsatellite markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4433-9.

Norose K, Aosai F, Mizota A, Yamamoto S, Mun HS, Yano A: Deterioration of visual function as examined by electroretinograms in *Toxoplasma gondii*-infected IFN-gamma-knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:317-21.

Fujimoto N, Zhang D, Sato E, Miyauchi O, Mizota A: Reversible changes in frequency-doubling perimetry with transiently elevated intraocular pressure. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:1540-3.

Hirai A, Mizota A, Mine S, Mizoe J: Two cases of orbital adenocarcinoma treated with heavy charged carbon particle irradiation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005 243(6):610-4.

Sakuma T, Tanaka M, Mizota A, Inoue J, Pakola S. Safety of in vivo pharmacologic vitreolysis with recombinant microplasmin in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:3295-9.

Matsumoto M, Hatakeyama S, Oyamada K, Oda Y, Nishimura T, Nakayama KI. Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics.* 2005 Nov;5(16):4145-51.

Nishimura T, Ogiwara A, Fujii K, Kawakami T, Kawamura T, Anyouji H, Kato H. Disease proteomics toward bedside reality. J Gastroenterol. 2005 Mar;40 Suppl 16:7-13. Review.

Fujii K, Nakano T, Kanazawa M, Akimoto S, Hirano T, Kato H, Nishimura T. Clinical-scale high-throughput human plasma proteome analysis: lung adenocarcinoma. Proteomics. 2005 Mar;5(4):1150-9.

Kawakami T, Tateishi K, Yamano Y, Ishikawa T, Kuroki K, Nishimura T. Protein identification from product ion spectra of peptides validated by correlation between measured and predicted elution times in liquid chromatography/mass spectrometry. Proteomics. 2005 Mar;5(4):856-64.

Fujii K, Nakano T, Hike H, Usui F, Bando Y, Tojo H, Nishimura T. Fully automated online multi-dimensional protein profiling system for complex mixtures. J Chromatogr A. 2004 Nov 19;1057(1-2):107-13. Erratum in: J Chromatogr A. 2005 Jan 21;1063(1-2):257.

Fujii K, Nakano T, Kawamura T, Usui F, Bando Y, Wang R, Nishimura T. Multidimensional protein profiling technology and its application to human plasma proteome. J Proteome Res. 2004 Jul-Aug;3(4):712-8.

Kawakami T, Nagata T, Muraguchi A, Nishimura T. Proteomic approach to apoptotic thymus maturation. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003 Apr 5;787(1):223-9.

K. Kobayashi, M. Shibutani, G. Takeuchi, K. Ohnuma, Y. Miyake, K. Negishi, K. Ohno, T. Noda. : Measurement of the single-pass MTF and simulation of the retinal image of the human eye by newly developed Point Spread Function Analysis System., SPIE Biomedical Optics of Photonics

West, 2003, (Paper Number: 4951-21), California, USA, 2003

Tachikawa T, Ohno K, T Noda, et al: Evaluation of Simultaneous Binocular Autorefractometry in Normal and Refractive or Anisometric Amblyopia. Annual meeting :The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2003, Ft. Lauderdale, Florida USA, 2003. 4. 29

M. Shibutani, K. Kobayashi, G. Takeuchi, K. Ohnuma, Y. Miyake, K. Negishi, K. Ohno, T. Noda: Simulated Retinal Images of Landolt Rings in Human Eyes Including Asymmetric Aberrations on the Point Spread Function Analysis System. SPIE Biomedical Optics of Photonics West, 2004. 1. 24

2. 出版

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」Bio Medical Quick Review Net 2004 記事番号 4001

http://www.medicaldo.co.jp/application_r.html 株式会社メディカル デウ

岩田 岳、渋谷 昌彦

「REF-1の機能解析: Applied Biosystems 1700 ケミルミネッセントマイクロアレイアナライザを用いた網膜色素上皮細胞増殖因子 REF-1の機能解析」 バイオビート

<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/biobeat> 日本アプライドバイオシステムズ株式会社

岩田 岳: 打倒! 加齢黄斑変性、眼科インストラクションコース 20-23, 2005

野田 徹: 細隙灯顕微鏡観察法の基本原則. 眼科診療プラクティス 6(8):2-9, 2003

野田 徹: 細隙灯顕微鏡による眼底観察法. 眼科診療プラクティス 6(8):10-20, 2003

野田 徹: 高屈折型倒像レンズによる眼底周辺部の観察. 眼科診療プラクティス 6(8):88-93, 2003

野田 徹：細隙灯顕微鏡の基本構造. 眼科診療
プラクティス 6(8):108-111, 2003

野田 徹：映像記録システム. 眼科診療プラク
ティス 6(8):108-111, 2003

野田 徹：細隙灯顕微鏡レーザーデリバリーシ
ステム. 眼科診療プラクティス 6(8):112-115,
2003

野田 徹：TAKAGI 細隙灯顕微鏡 SM-70. 眼科診
療プラクティス 6(8):139-141, 2003

野田 徹：TOPCON 細隙灯顕微鏡 SL-D7. 眼科診
療プラクティス 6(8):142-144, 2003

野田 徹：IMAGEnet. 眼科診療プラクティス
6(8):168-169, 2003

野田 徹：第一次硝子体過形成遺残と類縁疾患.
眼科診療プラクティス 6(8):168-169, 2003

野田 徹：眼球突出. 今日の治療指針. p1006,
山口徹, 北原光男編, 医学書院 東京, 2004

野田 徹, 秋山邦彦, 谷瑞子:24. 眼:涙嚢・涙管,
眼瞼, 結膜, 眼窩・涙腺, 眼球・眼筋, 角膜, 強膜,
ぶどう膜, 眼房・網膜, 水晶体・硝子体. 2003
年度版診療報酬点数表, 谷昌尚編, 医学通信社
東京, 2003

野田 徹:結膜の発赤(出血と充血). p218-220,
白浜雅司, 青木誠ほか編, 羊土社 東京, 2003

野田 徹：眼球運動障害. 小児眼科のABC：
小口芳久編, 日本医事新報社, 東京, 2003

学会発表

S. Umeda, M. T. Suzuki, H. Okamoto, F. Ono,
K. Terao, A. Mizota, Y. Yoshikawa, Y. Tanaka,
T. Iwata. Molecular Composition of Drusen
Observed in Hereditary Macular Degeneration
in Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*):
Similarities to Age-Related Macular
Degeneration in Human. Association for
Research in Vision and Ophthalmology, May

2005 Ft. Lauderdale, Florida, USA

M. Shibuya, Y. Tanaka, V. N. Reddy, J. Utsumi,
T. Iwata. Proteome analysis of RPE cells
treated with retinal pigment epithelial
cells factor-1 (REF-1). Association for
Research in Vision and Ophthalmology, May
2005 Ft. Lauderdale, Florida, USA

H. Okamoto, S. Umeda, M. T. Suzuki, K. Terao,
Y. Yoshikawa, Y. Tanaka, T. Iwata.
Comparative proteome analysis of macula
versus peripheral retina in cynomolgus
monkey.

Association for Research in Vision and
Ophthalmology, May 2005 Ft. Lauderdale,
Florida, USA

M. Akahori, M. Obazawa, S. Noda, Y. Tanaka,
T. Iwata.

Development of characterization of normal
tension glaucoma mouse over expressing
mutant of mutOPTN (E50K). Association for
Research in Vision and Ophthalmology, May
2005 Ft. Lauderdale, Florida, USA

S Umeda, R Ayyagari, R Allikmets, H Okamoto,
M T Suzuki, K Terao, Mizota A, Y Yoshikawa,
Y Tanaka, T Iwata. Linkage and mutation
analysis to identify the gene associated
with macular degeneration segregating in a
cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)
pedigree. Association for Research in
Vision and Ophthalmology, May 2004 Ft.
Lauderdale, Florida, USA

Shibuya M, Tanaka Y, Utsumi J, Mutoh M, Reddy
VN, Iwata T. Characterization of Novel
Growth Promotive Factor for Retinal Pigment
Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2.

Association for Research in Vision and
Ophthalmology, May 2004 Ft. Lauderdale,
Florida, USA

Izumi K, Kurosaka D, Mashima Y, Taya T, Osada
N, Oguchi Y, Tanaka Y, Iwata T. cDNA
Microarray Analysis of Gene Expression in
Cultured Human Corneal Fibroblasts

following TGF- β 2 Stimulation. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, May 2004 Florida, USA

Iwata T, Akahori M, and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. India Eye Research Group, Chennai, India August 2004

Iwata T and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. International Congress of Eye Research, Sydney, Australia October 2004

Iwata T, Akahori M, and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. American Society of Cell Biology, Washington DC, USA December 2004

Ayyagari R, Umeda S, Allikmets R, Karoukis AJ, Ambasadhan R, Okamoto H, Suzuki MT, Terao K, Mizota A, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Iwata T. Autosomal dominant macular degeneration in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree: Linkage and mutation analysis. American Society of Human Genetics, Toronto, Canada October 2003

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

3. 発表

S.Umeda, M.T. Suzuki, H.Okamoto, F.Ono, K.Terao, A.Mizota, Y.Yoshikawa, Y.Tanaka, T.Iwata. Molecular Composition of Drusen Observed in Hereditary Macular Degeneration in Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*): Similarities to Age-Related Macular Degeneration in Human. Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 2005 Ft. Lauderdale, Florida, USA

M. Shibuya, Y. Tanaka, V. N. Reddy, J. Utsumi, T. Iwata. Proteome analysis of RPE cells treated with retinal pigment epithelial cells factor-1 (REF-1). Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 2005 Ft. Lauderdale, Florida, USA

H.Okamoto, S.Umeda, M.T.Suzuki, K.Terao, Y.Yoshikawa, Y.Tanaka, T.Iwata. Comparative proteome analysis of macula versus peripheral retina in cynomolgus monkey. Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 2005 Ft. Lauderdale, Florida, USA

M. Akahori, M. Obazawa, S. Noda, Y. Tanaka, T. Iwata. Development of characterization of normal tension glaucoma mouse over expressing mutant of mutOPTN(E50K). Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 2005 Ft. Lauderdale, Florida, USA

S Umeda, R Ayyagari, R Allikmets, H Okamoto, M T Suzuki, K Terao, Mizota A, Y Yoshikawa, Y Tanaka, T Iwata. Linkage and mutation analysis to identify the gene associated with macular degeneration segregating in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree. Association for Research in

Vision and Ophthalmology, May 2004 Ft. Lauderdale, Florida, USA

Shibuya M, Tanaka Y, Utsumi J, Mutoh M, Reddy VN, Iwata T. Characterization of Novel Growth Promotive Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2. Association for Research in Vision and Ophthalmology, May 2004 Ft. Lauderdale, Florida, USA

Izumi K, Kurosaka D, Mashima Y, Taya T, Osada N, Oguchi Y, Tanaka Y, Iwata T. cDNA Microarray Analysis of Gene Expression in Cultured Human Corneal Fibroblasts following TGF- β 2 Stimulation. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, May 2004 Florida, USA

Iwata T, Akahori M, and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. India Eye Research Group, Chennai, India August 2004

Iwata T and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. International Congress of Eye Research, Sydney, Australia October 2004

Iwata T, Akahori M, and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. American Society of Cell Biology, Washington DC, USA December 2004

Ayyagari R, Umeda S, Allikmets R, Karoukis AJ, Ambasudhan R, Okamoto H, Suzuki MT, Terao K, Mizota A, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Iwata T. Autosomal dominant macular degeneration in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree: Linkage and mutation analysis. American Society of Human Genetics, Toronto, Canada October 2003

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. 知的所有権の出願・取得状況

1 特許取得	あり
2 実用新案登録	なし
3 その他	なし

III. 論文・出版物

Complement factor H polymorphisms in Japanese population with age-related macular degeneration

Haru Okamoto,¹ Shinsuke Umeda,¹ Minoru Obazawa,¹ Masayoshi Minami,¹ Toru Noda,¹ Atsushi Mizota,² Miki Honda,² Minoru Tanaka,² Risa Koyama,^{1,3} Ikue Takagi,⁴ Yoshihiro Sakamoto,⁵ Yoshihiro Saito,⁵ Yozo Miyake,¹ Takeshi Iwata¹

¹National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan; ²Department of Ophthalmology, Juntendo University Urayasu Hospital, Chiba, Japan; ³Tokyo College of Biotechnology, Tokyo, Japan; ⁴Division of Ophthalmology, National Hospital Organization Kyushu Medical Center, Fukuoka, Japan; ⁵Division of Ophthalmology, National Hospital Organization Osaka Medical Center, Osaka, Japan

Purpose: To study the frequency of five haplotypes previously reported in the complement factor H (*CFH*) gene for Japanese patients with age-related macular degeneration (AMD).

Methods: Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples taken from 96 Japanese AMD patients and 89 age-matched controls. All patients were diagnosed as having exudative (wet-type) AMD. The amplified polymerase chain reaction (PCR) products of *CFH* exons 2, 9, and 13, and intron 6 were analyzed by temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE) and by direct sequencing. The haplotypes were identified, and their frequencies were calculated and compared with reported results.

Results: Five haplotypes were identified in the Japanese population including four already reported in the American population. The frequencies of these haplotypes were significantly different between Japanese and American in both control and case groups. The haplotype containing Y402H, which was previously reported to be associated with AMD, was only 4% in the control and case population, with a *p* value of 0.802. However, two other haplotypes were found as risk factors, which gave an increased likelihood of AMD of 1.9 and 2.5 fold (95% CI 1.12-3.69 and 1.42-6.38). One protective haplotype that decreased the likelihood of AMD by 1.6 fold (95% CI 0.26-0.67) was identified.

Conclusions: The frequencies for five haplotypes previously identified were analyzed in a Japanese population with AMD. Four previously found haplotypes were identified and one additional haplotype was found. The frequencies of each haplotype were significantly different from that in found Americans affected with AMD. Two of the haplotypes were identified as risk factors and one was considered protective.

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of visual disability in the elderly in developed countries or in those with a predominant Caucasian population. The disease is characterized by poor vision in the central field due to a progressive destruction of the macular area. A hallmark of the early stage of AMD is the development of drusen, a complex mixture of proteins and cellular deposits, which accumulate between the retinal pigment epithelium (RPE) and Bruch's membrane. Recent studies have shown that drusen are composed of proteins related to activated complement and suppressor [1,2].

Recently, five studies reported that a tyrosine to histidine change at amino acid 402 (Y402H) has a T to C substitution at nucleotide 1277 in exon 9) of the complement factor H (*CFH*) gene was strongly associated with AMD [3-7]. Although the frequency of the C allele was not the same in all the reports, it was calculated to be between 0.61-0.94 in AMD cases and 0.34-0.46 in age-matched controls [5,7].

The *CFH* gene, located on chromosome 1q32, was the first of 13 distinct loci mapped on 11 chromosomes to be identified as being associated with AMD [8,9]. *CFH* functions as a cofactor in the inactivation of C3b by factor I, and it also increases the rate of dissociation of the C3bBb complex and the NBB complex in the alternative complement pathway [10]. *CFH* is also known to be decreased in individuals who smoke, the greatest risk factor for AMD [11].

The purpose of this study was to analyze the five haplotypes previously identified in the *CFH* gene in a Japanese population with exudative AMD and in age-matched controls.

METHODS

Age-related macular degeneration patients and age-matched controls: Blood samples were collected from 96 Japanese patients with exudative (wet type) AMD and 89 age-matched controls between 50-85 years old. AMD was diagnosed by ophthalmoscopic and fluorescein angiographic findings. In controls, no signs of early AMD, such as soft drusen or irregular pigmentations of the RPE in the macular area, were observed ophthalmoscopically. Informed consent was obtained from all participants, and the procedures used conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki.

Correspondence to: Takeshi Iwata, PhD, Laboratory of Cellular & Molecular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, 2-5-1 Higashigaoka, Meguro-ku, Tokyo, Japan; Phone/FAX: +81-3-34111026; email: iwataakeshi@kankakuki.go.jp

DNA extraction, sequence analysis of complement factor H gene, and statistical analysis: DNA was extracted from blood using a DNA isolation kit (QIAamp DNA Blood Maxi Kit, QIAGEN, Hilden, Germany). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of genomic DNA from AMD patients and controls was performed using gene-specific primers and LA-Taq polymerase (Takara Bio Inc., Ohtsu, Japan). The primers (forward primer: 5'-CCTAGAAAC CCTAAT GGAATG TG-3', reverse primer: 5'-CCG CTT CAA TAC GAC TTC ATT-3') were designed to amplify exons 8 and 9 of the *CFH* gene in approximately 1.3 Kb size. The amplified products were directly sequenced by CEQ2000XL DNA analysis system using a primer, 5'-CCG CTT CAA TAC GAC TTC ATT-3', and dye terminator sequencing kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Primers to identify each single nucleotide polymorphism (SNP) I62V (forward primer: 5'-ATA GAC CTG TGA CTG TCT AGG CA-3', reverse primer: 5'-CAG AGC CAG ACT CCA TCT CA-3'), IVS6 (forward primer: 5'-GCA TCT CAT AGCTTTTGACIT CA-3', reverse primer: 5'-ACT GTG TCC ATT CAG CTC CTA A-3'), and Q672Q (forward primer: 5'-CAA TAT GAA CAC CAT TCT TGA TTG-3', reverse primer: 5'-CACAGG TAC TCT CCT CCA CTATG-3'), were designed for amplification of these region. PCR products were analyzed with temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE; REVEAL, SpectruMedix, State College, PA) for sequence homozygosity or heterozygosity. Against known sequence templates. In the event of homozygosity, template DNA for one of the alleles was mixed at ratio of 1:1 to repeat the analysis. Statistical analysis was performed using single nucleotide polymorphism (SNP) and disease association software (SNPalyze version 5.0; DYNACOM, Chiba, Japan).

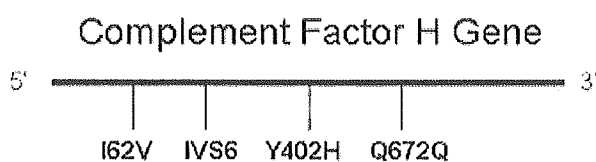
RESULTS & DISCUSSION

Using the four SNPs reported by Hageman et al. [6], we identified five haplotype blocks including one specific to the Japanese population. The frequency for each haplotype differed significantly from that previously described (Figure 1). Haplotype 5, which contains a T to C nucleotide substitution replacing tyrosine by histidine in exon 9, was found at a frequency of 4% for both controls and AMD cases, indicating no association with Japanese AMD. The genetic frequencies of the T/C allele for cases and controls were 85.42% and 88.76% for T/T homozygosity, 12.50% and 11.24% for T/C heterozygosity, and 2.08% and 0.00% for C/C homozygosity, respectively. The overall frequency of the C allele in cases (8.3%) and controls (5.6%) was significantly lower than that previously reported 61-94% in cases and in 34-46% in controls [3-7].

However, haplotypes 3 and 4 gave a 1.9 fold and 2.5 fold increased likelihood of AMD (1.12-3.69 and 1.42-6.38, respectively, 95% confidence interval [CI]; Figure 1). The frequencies of both haplotypes in the Japanese AMD population were between 15-19% independently. On the other hand, haplotype 2 was found as a protective allele, decreasing likelihood of AMD by 1.6 fold (95% CI 0.26-0.67). Haplotype 1, which was reported as 21% in the American population, gave highest frequency of 35% for both controls and patient cases in the Japanese population.

These results indicated that *CFH* is statistically associated with AMD in the Japanese population. Although the single Y402H allele was not associated with AMD, statistical analysis showed two haplotype blocks were associated with AMD. The frequency of AMD in Japan has been calculated based on

A:



B:

Haplotypes	p	Estimated frequencies				Risk (R) or protective (P) likelihood (fold JP/US)
		Cases		Controls		
		JP	US	JP	US	
H1: G T T G	1.000	0.38	N/A	0.38	N/A	1.0/-
H2: A T T A	0.001	0.18	0.12	0.35	0.21	(P) 1.6/1.7
H3: G T T A	0.028	0.19	N/A	0.10	N/A	(R) 1.9/-
H4: A T T C	0.004	0.15	N/A	0.06	N/A	(R) 2.5/-
H5: G T C A	0.802	0.04	0.50	0.04	0.29	(R) 1.0/1.7

Figure 1. Association analysis of Complement Factor H haplotypes. **A:** Four sets of single nucleotide polymorphisms (SNPs; I62V, IVS6, Y402H, Q672Q) were selected to distinguish all five haplotypes reported [6]. **B:** All haplotypes with a frequency >3% are displayed. The estimated frequencies for Japanese (JP) and American (US) cases and controls in these risk and protective haplotypes are shown (JP/US). The red "C" represents the nucleotide responsible for the Y402H polymorphism. N/A means "not available."

the study in Hisayama district of Kyushu, Japan. The incidence of late stage AMD, defined as the presence of neovascularization and geographic atrophy of the macula, was calculated to be 0.8% of the 1,482 residents [12]. This number is significantly lower than that of the Beaver Dam Eye Study (9% over 65 years of age and 28% for all stages of AMD) and other population studies [13-15]. The sum of frequencies for haplotypes 3 and 4 in AMD cases was 33.32%, indicating that a high proportion of AMD patients have either haplotype, whereas they were 15.6% for control. Our results showed that the responsible alleles and haplotypes for AMD may vary among different ethnic groups. Further analysis to discover new SNPs for *CHF* in the Japanese population may be required to establish further links between this gene and AMD.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank everyone who participated in this study. This research was supported by a grant from the National Hospital Organization for Sensory Organs Research.

REFERENCES

- Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 2000; 14:835-46.
- Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, Kamei M, Hasan A, Yan L, Rayborn ME, Salomon RG, Hollyfield JG. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:14682-7.
- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308:385-9.
- Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308:421-4.
- Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Noureddine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308:419-21.
- Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs KM, Smith RJ, Silvestri G, Russell SR, Klaver CC, Barbazetto I, Chang S, Yannuzzi LA, Barile GR, Merriam JC, Smith RT, Olsh AK, Bergeron J, Zernant J, Merriam JE, Gold B, Dean M, Allikmets R. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (*HF1/CFH*) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:7227-32.
- Zarepari S, Branham KE, Li M, Shah S, Klein RJ, Ott J, Hoh J, Abecasis GR, Swaroop A. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 2005; 77:149-53.
- Iyengar SK, Song D, Klein BE, Klein R, Schick JH, Humphrey J, Millard C, Liptak R, Russo K, Jun G, Lee KE, Fijal B, Elston RC. Dissection of genomewide-scan data in extended families reveals a major locus and oligogenic susceptibility for age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 2004; 74:20-39.
- Abecasis GR, Yashar BM, Zhao Y, Ghiasvand NM, Zarepari S, Branham KE, Reddick AC, Trager EH, Yoshida S, Bahling J, Filippova E, Elnor S, Johnson MW, Vine AK, Sieving PA, Jacobson SG, Richards JE, Swaroop A. Age-related macular degeneration: a high-resolution genome scan for susceptibility loci in a population enriched for late-stage disease. *Am J Hum Genet* 2004; 74:482-94.
- Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, Rodriguez de Cordoba S. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics* 2004; 56:77-82.
- Evans JR. Risk factors for age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20:227-53.
- Miyazaki M, Kiyohara Y, Yoshida A, Iida M, Nose Y, Ishibashi T. The 5-year incidence and risk factors for age-related maculopathy in a general Japanese population: the Hisayama study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:1907-10.
- Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992; 99:933-43.
- Klein R, Clegg L, Cooper LS, Hubbard LD, Klein BE, King WN, Folsom AR. Prevalence of age-related maculopathy in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Ophthalmol* 1999; 117:1203-10.
- Klein R, Klein BE, Cruickshanks KJ. The prevalence of age-related maculopathy by geographic region and ethnicity. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18:371-89.

The print version of this article was created on 6 Mar 2006. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.