

(57) Ruiz-Ederra J, Verkman AS. Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp Eye Res* 2006; 82:879-884.

(58) Anderson MG, Smith RS, Hawes NL, Zabaleta A, Chang B, Wiggs JL et al. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet* 2002;30:81-85.

(59) Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH. Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol* 2005;171:313-325.

(60) Libby RT, Li Y, Savinova OV, Barter J, Smith RS, Nickells RW et al. Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by Bax gene dosage. *PLoS Genet* 2005;1:17-26.

(61) Anderson MG, Libby RT, Gould DB, Smith RS, John SW. High-dose radiation with

bone marrow transfer prevents neurodegeneration in an inherited glaucoma. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:4566-4571.

(62) Steele MR, Inman DM, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML. Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:977-985.

(63) Stasi K, Nagel D, Yang X, Wang RF, Ren L, Podos SM et al. Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:1024-1029.

(64) Gould DB, Smith RS, John SW. Anterior segment development relevant to glaucoma. Int J Dev Biol 2004;48:1015-1029.

(65) McMahon C, Semina EV, Link BA. Using zebrafish to study the complex genetics of glaucoma. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2004;138:343-350.

我が国の先端的眼科研究の現場から  
失明を防ぐための多面的なアプローチ

岩 田 岳

## 我が国の先端的眼科研究の現場から 失明を防ぐための多面的なアプローチ

岩田 岳



ヒトが受信する情報の8割は視覚情報が占めると考えられており、眼は感覚器官の中でもとくに重要である。視覚障害は生活の質に著しく影響し、社会的・経済的にも大きな負担を強いる。世界中で失明予防の研究が盛んに行われているが、今回はとくに研究成果が著しい加齢黄斑変性と緑内障について筆者らの研究を中心に紹介したい。

キーワード：眼、加齢黄斑変性、緑内障、予防医学、疾患動物モデル

### はじめに

ヒトは情報の8割を視覚に依存すると考えられており、眼は最も重要な感覚器官である。視覚障害は生活の質に著しく影響し、社会的・経済的にも大きな影響を及ぼす。世界保健機構(World Health Organization、<http://www.who.int/en/>)によると、2002年には世界中で1億6100万人の視覚障害者が存在したと報告されており、そのうち1億2400万人が中度の視覚障害、3700万人が失明していたと推定している。視覚障害となる原因については外傷、感染、糖尿病などがあるが、人種や経済状態によって各国で異なっている。疾患別に世界的規模でみると、670万人が白内障(Cataract)、緑内障(Glaucoma)および加齢黄斑変性(AMD)によって失明しており、その他に角膜白濁(Corneal opacities)、糖尿病網膜症(Diabetic retinopathy)などが続く(図1)。先進国においては白内障手術の目覚ましい進歩によって失明率が急激に低下しており、日本では緑内障が最も多いのに対して、アメリカやヨーロッパでは白人を中心に加齢性黄斑変性の患者が多い。緑内障や加

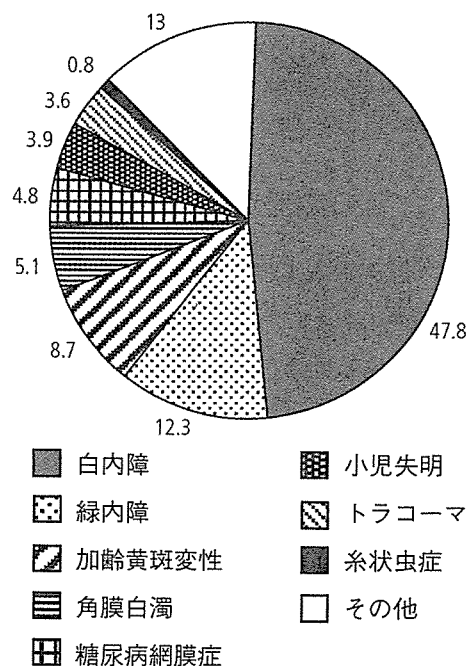


図1 世界の視覚障害の割合 (世界保健機構 2002)

### Current progress of eye research

筆者紹介：いわた・たけし(IWATA, Takeshi) (独)国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター(感覚器センター)視覚研究部門 細胞・分子生物学研究室(Natl. Hospital Organization Tokyo Med. Cent. Natl. Inst. of Sensory Organs Div. of Vision Res. Lab. of Cellular & Molecular Biol.) 細胞・分子生物学研究室長 農学博士 専門：細胞分子生物学 連絡先：〒152-8902 東京都目黒区東ヶ丘2-5-1 E-mail iwatatakeshi@kankakuki.go.jp (勤務先)

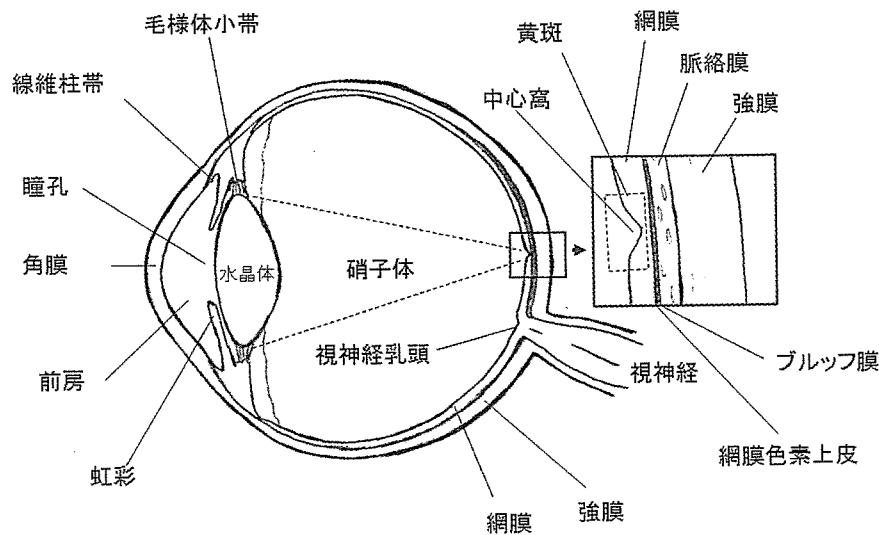


図2 眼の基本構造

加齢黄斑変性は遺伝、環境そして生活習慣がリスク因子となって発症すると考えられている。加齢黄斑変性や緑内障の発症によって網膜での細胞死が起こると、これを移植によって補ったり、神経細胞を増殖させたりすることが困難であるため、国内外で視神経の再生医療や人工網膜の開発が行われている。筆者らは病気に至る前の段階でこれを察知し、患者予備軍を選別し、発症する前に予防法によって食い止める、「予防医学」の観点からこれまで研究を行ってきた。

### 1. 眼の基本構造と検体収集の難しさ

眼は組織学的に高度に分化しており、角膜や水晶体からなる前眼部と網膜、視神経からなる後眼部から構成されている(図2)。角膜および水晶体で収束した光は黄斑を中心に像を結び、光情報は電気信号に変換されて脳に伝えられる。このいずれの過程においても障害が発生した場合には視覚障害につながる可能性がある。眼研究の難しさは、病気の患者から組織の一部を切り出し、研究に利用することが極めて困難なことである。また法律上、死者の眼球を実験に利用することも、アメリカとは異なって、日本では禁じられている。予防医学的観点からも、早期診断に利用できる検体が涙液、血液、尿に限られるために、必然的に研究対象は白血球から抽出されるDNAを用いた遺伝子解析と血漿プロテオーム解析に落ち着くことになる。白内障や網膜疾患の手術中に捨てられる房水、硝子体の一部

については、患者の同意を得れば倫理的に研究対象として承認されている。

### 2. 感覚器ネットワーク構築による症例情報収集システムとDNA・血漿バンクの設立

2004年、国立病院機構および厚生労働省の支援を受けて、オンラインによる症例情報の収集とDNA・血漿バンクの設立を目的とした「感覚器ネットワーク」を感覚器センターに構築した(図3)。関連施設の国立病院および大学病院から緑内障と加齢黄斑変性の症例情報をウェブ画面上から登録し、同時に血液検体を発送する仕組みである。症例情報には個人情報を除く患者の臨床所見が詳細に登録できるようになっており、眼底写真の添付も可能である。遺伝子およびプロテオミクスの解析結果は症例情報と一体化され、個々の患者について総合的なデータベースが構築されることにより、眼科分野におけるテーラーメイド医療の可能性を模索する。インターネットを介した症例情報の送受信に対しては計画当初より倫理的観点からの反対意見もあったが、認証技術と暗号化技術の進歩によって信頼できるシステムが構築されている。

### 3. ハプロタイプを利用した加齢黄斑変性のリスク遺伝子の探索

加齢黄斑変性は黄斑周辺において網膜色素上皮細胞とブルッフ膜の間にドルーゼン(網膜下に蓄積する

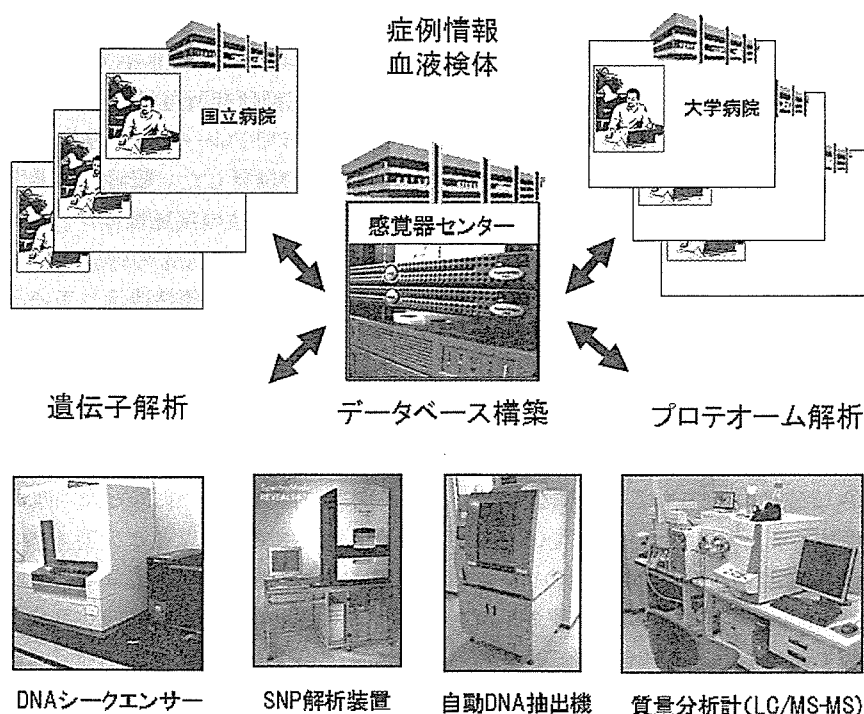


図3 感覚器センターの遺伝子解析システムとデータベースシステム

黄・白色の物質)が蓄積することから始まり、網膜色素上皮細胞死から視細胞死、そして脈絡膜から神経網膜に向って血管新生が起こることによって失明する病気である(図2)。これまでの研究から加齢黄斑変性は多因子疾患であると考えられ、加齢、遺伝、喫煙、肥満、青い光などがリスク因子として報告されている。加齢黄斑変性を発症しやすい体質があるとすれば、それはヒトの設計図であるゲノム配列と深く関係しており、2万2000遺伝子中のいくつかが関係していることになる。近年、ヒトゲノムプロジェクトによる全ゲノム配列が解読された結果、ゲノム上には平均で1000塩基に1つの割合で異なる配列が存在することが明らかになった。この遺伝子多型(Single Nucleotide Polymorphism : SNP)を複数組み合わせることでブロックとして利用することにより、疾患遺伝子の位置を特定することが可能になってきた。SNPの組合せをハプロタイプと呼ぶが、複数の国が参加して、すべてのハプロタイプを明らかにする国際ハップマッププロジェクト(International HapMap Project, <http://www.1hapmap.org/>)が進行中である。ゲノムには1千万個のSNPが存在すると計算されるが、これだけのSNPを安価に解析することは技術的に困難であった。しかし、最近、SNP-DNAチップの開発が進み、複数の

SNPを同時に検出することができるようになってきた。Affymetrix社が販売するGENECHIP™を利用すれば50万個のSNPを一度に解析することができる。このチップを利用しても全SNPの5%しかカバーできないが、計算によって有用な情報が豊富に得られる。疾患に関するSNPの発見は加齢黄斑変性の早期診断装置の開発につながる。加齢性の疾患であることから、早期発見ができれば予防に努めることができるし、人生設計の修正が発症前に可能になる。SNPによってアミノ酸配列に変異が生じる場合はタンパク質の機能解析によって、発症機序の解明と発症を未然に防止する有効な予防薬の開発も可能になる。このような理由から、加齢黄斑変性のリスク因子の1つである遺伝子解析について積極的に研究が進められている。

#### 4. 眼疾患のためのプロテオミクスとバイオマーカーの探索

SNP解析によってリスク遺伝子が明らかになり、発症前遺伝子診断が確立されても個々の患者について予防を始めるタイミングを決めるのは難しい。あまり早期に始めると医療費がかさみ、遅すぎると発症してしまう可能性がある。発症前の兆候を察知して予防の

タイミングを計る方法として、血漿や尿に含まれる微量タンパク質の濃度変化をとらえる方法が考えられる。網膜の裏側に位置する脈絡膜(図2参照)の血流循環速度は毎分1~2Lと極めて早いことが知られている。視細胞への酸素とグルコースの供給、老廃物の除去、さらに網膜の温度上昇を防ぐためのラジエーターとしての働きも推測されている。脈絡膜の関与が予想される加齢黄斑変性については脈絡膜や網膜成分が血中に漏れてくることも予想され、疾患バイオマーカーの探索に期待がかかる。

網羅的な血漿プロテオーム解析には質量分析計が用いられるが、この分野においても技術革新は目覚しく、毎年、より感度の高い製品が販売されるようになった。質量分析計の高感度化と並行して進められているのが試料の前処理である。血漿の場合、20種類のタンパク質が重量換算で99%を占めるために微量タンパク質がなかなか検出されにくい。この20種類のタンパク質について、残り1%のタンパク質濃度を変化させずにいかに除去できるかという課題が残っている。最近、20種類のタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いたアフィニティーカラムの販売が始まった。

## 5. 疾患動物モデルの開発とその意義

患者の病理組織を得ることが難しいことから、疾患による細胞や分子レベルでの変化をとらえることが極めて困難であった。このために古くからヒトの眼疾患に類似する動物の探索や、遺伝子操作によるDNA組換え動物の作製が行われてきた。疾患動物モデルは動物種にもよるが、発症機序の解明だけでなく、新薬開発のバイオアッセイ系や診断装置の開発など、幅広く利用できることが特色である。これまでにマウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、ブタ、ニワトリ、ゼブラフィッシュなど、多岐にわたる動物モデルが発見または作製されてきた。霊長類の眼の特徴としてはそのサイズと網膜の中心に存在する黄斑の存在である(図2、4参照)。

黄斑は外側に向かって中心窩がくびれた構造になっており、光を感じる錐体細胞が露出した構造になっている。また網膜の20%の錐体細胞(92万個の細胞)が直径6mmの黄斑に集中しており、高い解像度の視覚を獲得している。このような構造は霊長類(ヒト、サル)、一部の鳥類など限られた種でしか発達しておらず、一般的に実験に用いるマウスやラットには黄斑は存在し

ない。黄斑が傷害される加齢黄斑変性の霊長類モデルは1970年代から世界中で探し続けられてきたが、(独)医薬基盤研究所霊長類医学科学研究センターにおいて生後2年でドルーゼンを発症するカニクイザルを鈴木通弘等が発見した。筆者らは厚生労働省の支援を受けて、この1頭の疾患個体から交配実験を繰り返し、300頭から成る大家系の作製に成功した。交配実験から疾患が常染色体優性遺伝していることが明らかになり、原因遺伝子の染色体上での位置を探索中である(図5)。

平成15年からは厚生労働科学研究・難治性疾患克服研究事業として、研究班を組織して疾患カニクイザルの本格的な研究が始まった。加齢黄斑変性の霊長類モデルが稀であることと、アメリカやヨーロッパの白人において有病率が高いことから、筆者らの研究成果は欧米の眼科学会で広く知られることになった。疾患カニクイザルの遺伝形式から考えて、おそらく単一遺伝子の変異によって網膜・脈絡膜の代謝に異常が発生すると考えている。

## おわりに

眼科研究でとくに今日注目されている加齢黄斑変性について筆者らの研究を中心に紹介させていただいた。日本の眼科は長い歴史があるにもかかわらず、基礎研究においては欧米に比べて基盤の整備が遅れている。中心的研究機関(国立眼研究所)もなく、政府の十分な認識が得られない状態が続いてきた。日本では急

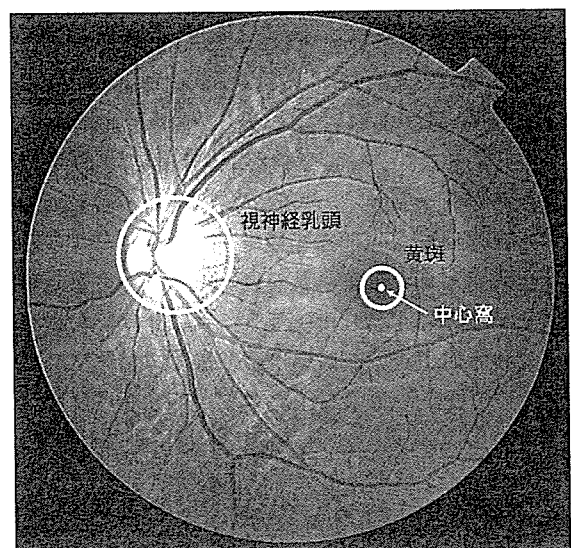


図4 ヒトの眼底写真

速な高齢化によって視覚障害者はすでに増加しており、加齢性眼疾患の早急な対策が求められている。米国ではNational Eye Instituteが大学を束ねて国家戦略として、次々と新しい基礎研究者を眼分野に招き入れて活性化を図り、同時に政府の十分な認識が得られるように努力している。

日本でも眼科と耳鼻科を統合した「感覚器センター」構想が15年ほど前から検討され、2004年から国立病院機構東京医療センター臨床研究センターとして「感覚器センター」が発足した。また、2006年6月には厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会によって、2007年度から5年間の戦略研究課題として「感覚器戦略研究」が承認された。少しずつではあるが、日本でも認識が得られるようになってきた。アジアに目を向けるとシンガポール、韓国、中国でも眼研究所が整備されつつある。日本人と欧米人とは遺伝的背景が異なることから、診断基準や薬効に

ついて違いがあることが指摘されてきた。より日本人と体質に近いアジアの人々と連携しながら、遺伝子やプロテオーム解析が進めば、日本人向けの薬がアジアでも十分な効果を発揮する可能性がある。今後、日本に眼科の中心的な研究機関が設立され、これを日本の表玄関として、アジアの中心的な研究機関と共同研究プロジェクトを組み、日本人を含むアジア人のための製品造りに進む流れが期待される。

#### 参考文献

- 1) 岩田 岳：加齢黄斑変性の遺伝子研究の最前線，特集：網膜脈絡膜変性疾患のアップデート，あたらしい眼科，(株)メディカル出版，23，1125～1131 (2006)
- 2) James, F. H. *et al.* : Models of age related vision problems, p.812～828. Handbook of Models for Human Aging, Academic Press, Elsevier Inc (2006)

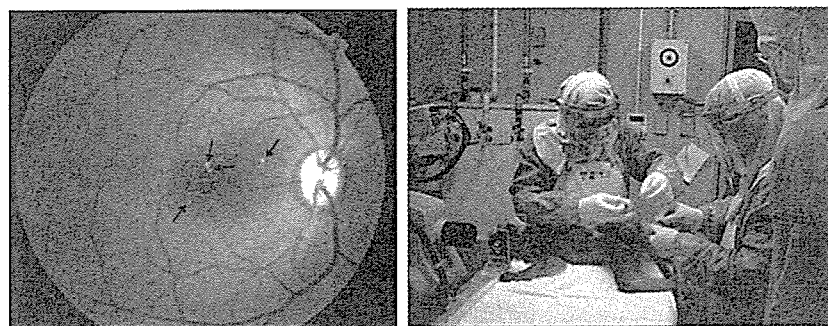
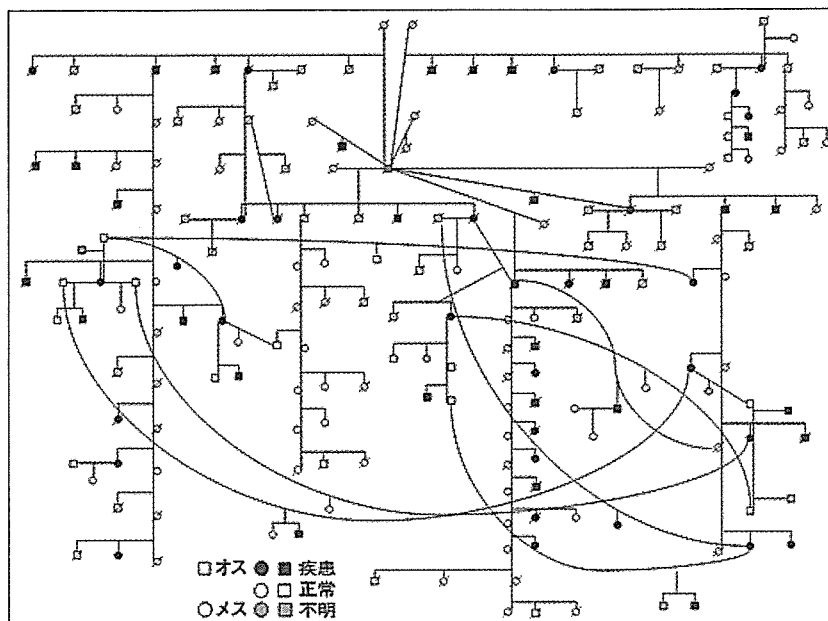


図5 上：遺伝性の黄斑変性カニクイザルの家系<sup>6)</sup>  
 左下：眼底写真と黄斑に観察されるドルーゼン  
 右下：霊長類医学科学研究センターでの実験

- 3) Okamoto, H. *et al.* : Complement factor H polymorphisms in Japanese population with age-related macular degeneration, *Mol. Vis.*, 12, 156～158 (2006)
- 4) 岩田 岳：遺伝子解析の現状、またその行方は？、打倒！加齢黄斑変性，眼科インストラクションコース，(株)メディカルビュー，20～23 (2005)
- 5) Umeda, S. *et al.* : 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)
- 6) Umeda, S. *et al.* : 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)



# 加齢黄斑変性の遺伝子研究の最前線

*Recent Progress in Genetic Analysis of Age-Related Macular Degeneration*

岩田 岳

---

あたらしい眼科 *Atarashii Ganka (J. Eye)*  
Vol. 23 No. 9 2006 別刷

---

(株)メディカル葵出版

# 加齢黄斑変性の遺伝子研究の最前線

## Recent Progress in Genetic Analysis of Age-Related Macular Degeneration

岩田 岳\*

### はじめに

加齢黄斑変性は多因子疾患であると考えられ、加齢、遺伝そして環境などのリスク因子が作用して時間をかけて発症する<sup>1)</sup>(表1)。加齢黄斑変性を発症しやすい体質があるとすれば、それはヒトの設計図であるゲノム配列と深く関係している。今日の遺伝子解読技術を用いれば、特定の遺伝子配列を解読することは比較的簡単であるが、問題はヒトゲノムには22,000ほどの遺伝子が存在し、どの遺伝子が加齢黄斑変性に関係するかわからないことである。最近になって、ようやく候補となる遺伝子が複数明らかになってきた。疾患に関係する遺伝子配列の発見は加齢黄斑変性の早期診断につながり、また発症までに時間があることから、有効な予防法による発症の遅延や人生設計の変更が可能になる。リスク遺伝子の機能解析によって、発症を防止する有効な薬の開発の可能性もある。このような理由から、加齢黄斑変性のリスク因子の1つである遺伝子についての研究が進められている。本稿では、加齢黄斑変性のリスク因子としての遺伝子解析について最新の状況をお伝えしたい。

### I 加齢黄斑変性の候補となる遺伝子の探索

加齢黄斑変性のリスク遺伝子を探索するにあたって、最も可能性の高い候補は、類似の症状が観察される黄斑ジストロフィの原因遺伝子である。先天性の黄斑ジストロフィは単一遺伝子の変異によって発症するものが多く、大家系を使った連鎖解析法によって原因遺伝子の染

表1 加齢黄斑変性のリスク因子

(1) 加 齢	高齢化：米国では65歳以上の失明率が最も高い疾患。
(2) 遺 伝	家族歴：親族のなかに加齢黄斑変性の患者がいる場合により高いリスクが生じる。 人 種：白人は黒人に比べて加齢黄斑変性を発症しやすい。日本人はその中間に位置する。 性 別：白人では女性に優位に発症するが、日本人では男性に優位に発症する。
(3) 環 境	喫 煙：喫煙は複数の疫学調査によって高いリスク因子として報告されている。 肥 満：肥満は加齢黄斑変性の進行に関係していると考えられている。

表2 これまでに報告されている加齢黄斑変性のリスク遺伝子

(1) ATP-binding cassette transporter ( <i>ABCA4</i> )
(2) Fibulin 6 ( <i>Hemicentin 1</i> )
(3) Complement component 2
(4) Complement factor B
(5) Complement factor H
(6) Fibulin 5 ( <i>FBLN5</i> )
(7) Hypothetical Protein LOC387715
(8) Toll-like receptor 4

色体上での位置を絞り込み、その周辺の遺伝子を網羅的に調べるポジショナルクローニング法によって、14の候補遺伝子の7つがすでに発見されている。発見された7つの遺伝子と加齢黄斑変性との関係については複数の研究グループが解析を行ったが、常染色体劣性遺伝の

\* Takeshi Iwata : 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(感覚器センター)視覚研究部門 細胞・分子生物学研究室  
〔別刷請求先〕 岩田 岳 : 〒152-8902 東京都目黒区東が丘 2-5-1 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(感覚器センター) 視覚研究部門 細胞・分子生物学研究室

国際 HapMap 計画は、ヒトの病気や薬に対する反応性に関わる遺伝子を発見するための基盤を整備するプロジェクトです。この計画は、カナダ、中国、日本、ナイジェリア、英国、米国の科学者と各国政府、財団などの協力により行われています。詳細は [国際 HapMap 計画](#) についてをご覧ください。

**プロジェクトの情報**

- プロジェクトについて
- HapMap 文献
- HapMap Tutorial
- HapMap News メールングリスト
- 参加施設, 参加者
- HapMap 日本のミラーサイト

**データ**

- Generic Genome Browser
- データ全体のダウンロード
- 論文準備のため、データを固定します
- ENCODE Project
- データ使用に関するガイドライン

**リンク**

- プレスリリース
- NHGRI HapMap Page
- NCBI Variation Database (dbSNP)
- Japanese SNP Database (JSNP)

**News**

- 2005年10月24日: 第19回目のデータリリース  
 Phase I と Phase II の genotype, frequency, assay データが利用可能です。一括ダウンロードは[こちら](#)から, Phase I と Phase II のデータが統合されています。

Populations	CEU	CHB	JPT	YRI
Total QC+ SNPs	3,901,408	3,903,524	3,902,623	3,806,920
Total Genotyped SNPs	5,894,684	5,812,990	5,812,990	5,857,466

- 2005年9月28日: 第18回目のデータリリース  
 第2, 6, 11, 14, 15, 21染色体の genotype, frequency, assay データのアップデート分が利用可能です。一括ダウンロードは[こちら](#)から。これらには CEU 及び YRI サンプルについての Phase II の完全なデータが含まれており, Phase I と Phase II のデータが統合されています。今回のリリースのサマリーは以下のとおりです。

Populations	CEU	CHB	JPT	YRI
Chr 2	527,434	354,069	354,069	527,707
Chr 6	385,351	124,729	124,729	386,208
Chr 11	295,079	52,669	52,669	293,444
Chr 14	173,577	65,117	65,117	170,624
Chr 15	149,378	41,399	41,399	147,373
Chr 21	86,213	37,932	37,932	85,417
Total	1,817,032	675,915	675,915	1,810,773

- 2005年8月17日: HapMap Phase II の初回データ公開  
 Phase II の初回公開分のデータが、[こちら](#)から **bulk download** ダウンロードできます。このリリースは、パイロットスタディである第2染色体短腕のデータです。以前の Phase I のデータ (16c.1) を補充するもので、両者のデータファイルを結合することで完全なデータとなります。新しく600, 180についてタイピングが行われ、総計54, 016, 200のデータポイント情報が公開されています

- これまでの News

**参加施設**

- Baylor College of Medicine (USA)
- Beijing Genomics Institute (China)
- Beijing Normal University (China)
- Broad Institute of Harvard and MIT (USA)
- Center for Statistical Genetics, University of Michigan (USA)
- Chinese National Human Genome Center at Beijing (China)
- Chinese National Human Genome Center at Shanghai (China)
- Cold Spring Harbor Laboratory (USA)
- Eubios Ethics Institute (Japan)
- 北海道医療大学 (Japan)
- Hong Kong University of Science and Technology (China)
- Howard University (USA)
- Illumina (USA)

- Johns Hopkins School of Medicine (USA)
- McGill University & Génome Québec Innovation Centre (Canada)
- ParAllele BioScience (USA)
- Perlegen Sciences (USA)
- 理化学研究所 (Japan)
- The Chinese University of Hong Kong (China)
- The University of Hong Kong (China)
- University of California, San Francisco (USA)
- University of Ibadan (Nigeria)
- University of Oxford (UK)
- University of Oxford / Wellcome Trust Centre for Human Genetics (UK)
- 東京大学 (Japan)
- University of Utah (USA)
- Washington University, St. Louis (USA)
- Wellcome Trust Sanger Institute (UK)

**政府、財団等**

- Chinese Academy of Sciences
- Chinese Ministry of Science and Technology
- Delores Dore Eccles Foundation
- Genome Canada
- Génome Québec
- Hong Kong Innovation and Technology Commission
- 文部科学省
- Natural Science Foundation of China
- The SNP Consortium
- U.S. National Institutes of Health (NIH)
- University Grants Committee of Hong Kong
- Wellcome Trust
- W.M. Keck Foundation

図 1 国際 HapMap プロジェクトのホームページ

Stargardt 病の原因遺伝子である ATP-binding cassette transporter 遺伝子 (*ABCA4*) を除いて相関は見つかっていない<sup>2)</sup>。現在までに加齢黄斑変性との相関が報告されている遺伝子を表 2 にまとめた。

これまで未知遺伝子の探索で利用されてきた連鎖解析法を用いて地道に連鎖解析マーカーと疾患との相関を調べる作業が今日も続いている。連鎖解析とはヒトゲノム中にある塩基配列の反復とその反復回数に個人差があることを利用して、あるゲノム上の反復配列とその反復回数が疾患と一しょに遺伝しているか調べることによって原因遺伝子の染色体上での位置を絞り込む方法である。加齢黄斑変性は複数の遺伝子が関与していることから、複雑に遺伝するが、多数の家系を調べた結果、統計的に候補となる遺伝子は染色体 1, 2, 4, 5, 9, 10, 12, 15, 16, 18, 20 の 13 の位置に存在すると予測されている<sup>3,4)</sup>。

## II ハプロタイプを利用した加齢黄斑変性のリスク遺伝子の探索

近年、ヒトゲノムプロジェクトによる全ゲノム配列が解読された結果、ゲノム上には平均で 1,000 塩基に 1 つの割合で異なる配列が存在することが明らかになった。この遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism :

SNP) の生体への影響についてはまだ明らかになっていないが、その利用方法については注目されている。ゲノム上の単一の SNP、たとえばアデニン (A) からグアニン (G) の変化を疾患に結びつけることは困難であるが、SNP を複数組み合わせることでブロックにして利用することにより、連鎖解析マーカーと同様な利用方法ができる。SNP の組み合わせをハプロタイプとよぶが、複数の国が参加して、すべてのハプロタイプを明らかにする国際ハップマッププロジェクト (International HapMap Project, <http://www.hapmap.org/>) が進行中である (図 1)。

ゲノムの大きさが  $3 \times 10^9$  塩基であることから 1 千万個の SNP が存在すると計算されるが、これだけの SNP 数を安価に効率よく解析することは技術的に困難であった。しかし、最近、シリコンをベースにした DNA チップの開発が進み、複数の SNP を同時に検出することができるようになってきた (図 2)。Affymetrix 社が販売する GENECHIP<sup>TM</sup> を利用すれば最大 50 万個の SNP を同時に解析することができる。このチップを利用しても全 SNP の 5% しかカバーできないが、今後測定できる SNP 数は増加していくと思われる。

## III 補体の活性化と加齢黄斑変性

加齢黄斑変性の前兆として網膜色素上皮細胞と Bruch

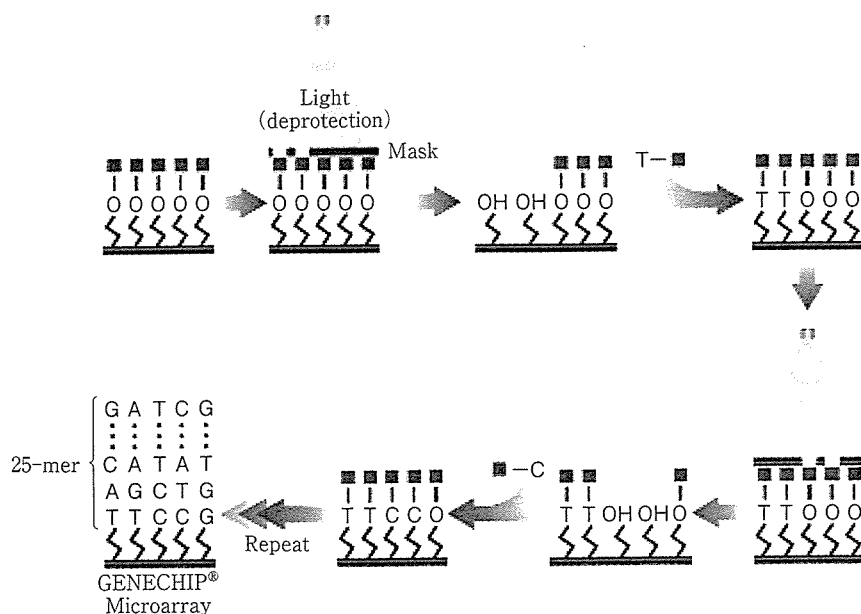


図 2 GENECHIP<sup>TM</sup> の製造工程

膜の間にドルーゼンの蓄積が観察される。ドルーゼンの蓄積とドライ型やウエット型の加齢黄斑変性への進行との関係は不明のままであるが、最近の研究によってドルーゼンを構成する分子は明らかになってきた。Hageman や Anderson らは糸球体腎炎の患者でドルーゼンに類似する眼底所見が得られることから、糸球体の炎症に関わる補体の活性化が網膜下でも起こっていることを免疫染色法によって発見した<sup>5-7)</sup>。さらに、Hollyfield らもドルーゼンを抽出してその蛋白質組成について質量分析計を使って分析したところ、補体の活性分子の存在を確認した<sup>8)</sup>。ドルーゼン内で発見された分子のなかにはアミロイドβ関連分子や酸化ストレス関連分子など、補体活性化の原因になりうる分子も確認されている。

このような研究が進むなかで2005年に補体H因子(complement factor H)のハプロタイプと加齢黄斑変性との相関を示す5つの論文が報告された<sup>9-13)</sup>。この遺伝子は自然免疫の補体活性化を抑制する蛋白質で補体の2次経路およびレクチン経路を抑制する(図3)。いずれの論文もアミノ酸402番のヒスチジンからトリプトファンの置換が加齢黄斑変性と強く連鎖することを報告した。しかしこの多型が患者および健常者に現れる頻度については論文によって異なっている。Haines らの論文

ではY402Tは健常者(185人)で46%、患者(495人)では96%の頻度で現れると報告している<sup>10)</sup>が、Zarepari らの論文では健常者(275人)で34%、患者(616人)で61%と異なっている<sup>13)</sup>。筆者らは日本人における補体H因子と加齢黄斑変性の関わりについて、独自の解析を行うことにした。DNA検体は患者や健常者の承諾を得て、国立病院機構東京医療センター、国立病院機構大阪医療センター、国立病院機構九州医療センター、順天堂大学浦安病院眼科から健常者89検体と患者96検体を集めて行われた。その結果、健常者(89人)4.3%、そして患者(96人)で3.8%とアメリカの解析結果と大きく異なることが明らかにされた<sup>14)</sup>。2005年のアメリカ眼研究学会(ARVO)でも補体H因子のY402変異の生体機能への影響について議論されたが、筆者らの報告によってY402H変異と加齢黄斑変性との関係が絶対的なものではないことから、さらに詳細な検討が必要であるとセッションが締めくくられた(図4)。最近、Gotoh らによっても筆者らと類似する報告がなされている<sup>15)</sup>。

補体活性経路に関係する遺伝子と加齢黄斑変性との関係はAllikmets らの最近の論文によってさらに強固なものになりつつある<sup>16)</sup>(図5)。この報告では補体古典経路のC2と2次経路を抑制する補体B因子のハプロタイプ

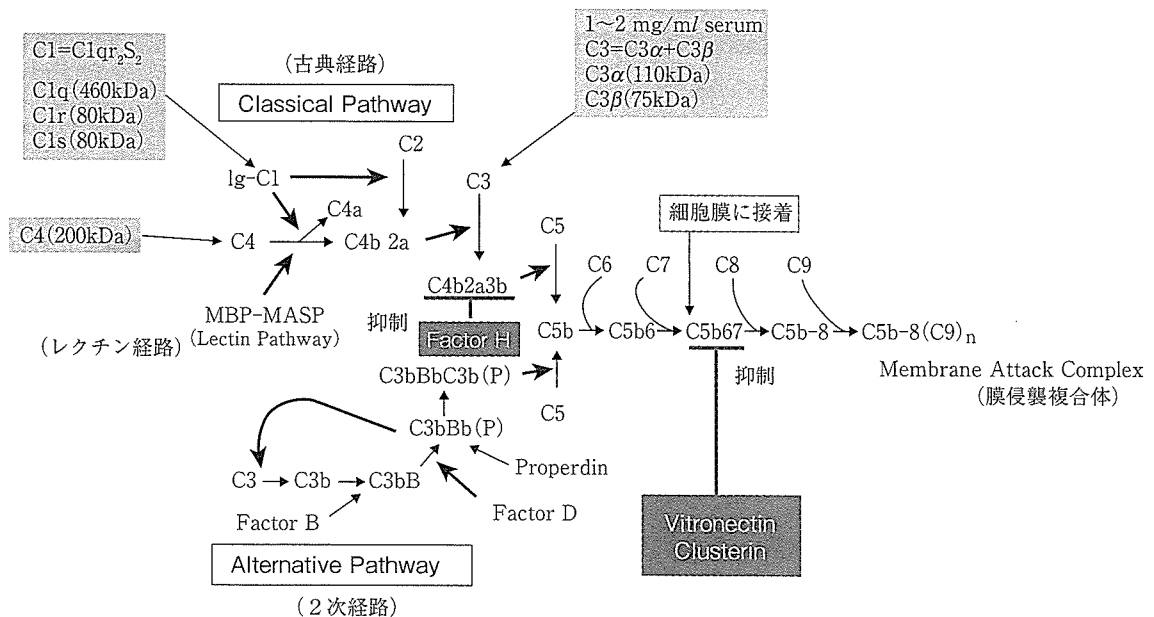
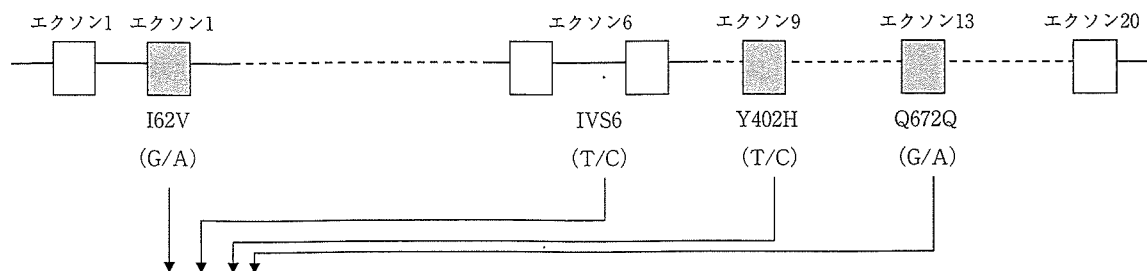


図3 補体活性化経路



	ハプロタイプ (米国)	OR	95% CI	p	患者 (%) 日本/米国	健常者 (%) 日本/米国	リスクとプロテクティブ 日本/米国
ハプロタイプ 1	G-T-T-G (3)	NS	—	0.973	3.8/NS	3.8/NS	—/—
ハプロタイプ 2	A-T-T-A (2)	0.42	0.26~0.67	0.001	18/12	35/21	(ブ) 1.6/1.7
ハプロタイプ 3	G-T-T-A (5)	2.03	1.12~3.69	0.028	19/NS	10/NS	(リ) 1.9/—
ハプロタイプ 4	A-T-T-G	3.00	1.42~6.38	0.004	15/NS	6/NS	(リ) 2.5/—
ハプロタイプ 5	G-T-C-A (1)	NS	—	0.744	3.8/50	4.3/29	(リ) —/1.7

図4 日本人における加齢黄斑変性と補体 H 因子のハプロタイプ

	E318D	Int10	L9H	R32Q	R150R	K565E	Int17	OR	p	CAS	CON
H1	G	G	T	G	G	A	G	1.32	0.0013	0.59	0.53
H2	G	G	T	G	G	A	A				
H5	G	G	T	G	A	A	A				
H7	G	T	T	A	G	A	A	0.45	<0.0001	0.050	0.11
H10	C	G	A	G	G	A	G	0.36	<0.0001	0.020	0.055

図5 アメリカ人における加齢黄斑変性と補体 C2 と B 因子のハプロタイプ (文献 16 より)

がプロテクティブ (予防) に働くことが明らかにされている。日本人におけるハプロタイプの解析は現在筆者らの研究室で進行中である。

#### IV ドルーゼンが観察される霊長類モデルの遺伝子解析

加齢黄斑変性の動物モデルとして黄斑が発達している霊長類モデルが長年探し続けられてきたが、独立法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにおいて生後2年でドルーゼンを発症するカニクイザルが Suzuki らによって発見された<sup>17)</sup>。この1頭の疾患個体から交配によって大型の家系を作ること成功し、この過程で疾患が常染色体優性遺伝していることも明らかになった (図6)。

筆者らは厚生労働省科学研究難治性疾患克服研究事業として研究班を組織して平成15年度からこのカニクイザルの病理学および遺伝子解析を行ってきた<sup>18~20)</sup>。これまでの研究からこの疾患個体で観察されるドルーゼンの蛋白質組成は患者や加齢性の黄斑変性カニクイザルと類似していることが明らかになっている。遺伝形式からおそらく単一遺伝子の変異によって網膜下の代謝に異常をきたし、ヒトが50年以上かけて蓄積するドルーゼンと同様なドルーゼンをわずか2年で生成すると予測される。この遺伝子の発見はドルーゼン生成のメカニズムを解き明かす重要な情報をもたらす可能性もあり、その結果に注目している。

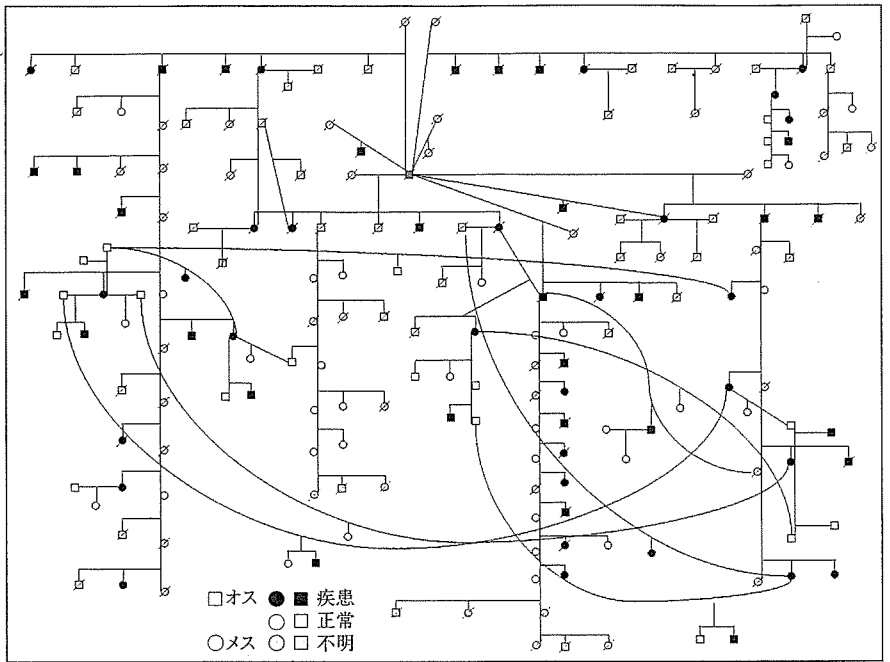
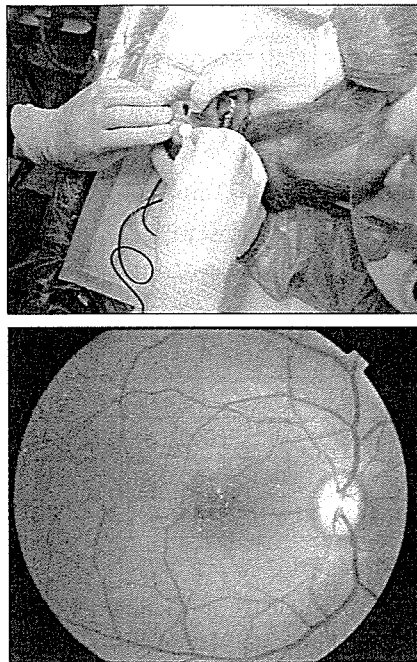


図 6 若年性黄斑変性カニクイザルの家系

## V 今後の加齢黄斑変性の遺伝子解析

加齢黄斑変性の遺伝子研究については候補となる遺伝子がすでに黄斑ジストロフィや網膜色素変性症から補体関連遺伝子に移行しており、今後加速すると考えられる。補体関連分子は図3に示してあるように、補体活性系および抑制系は多数の遺伝子から構成されているので、これをすべて調べるまでには時間がかかることが予想される。また加齢黄斑変性が多遺伝子疾患であることから、多数のSNPを組み合わせたハプロタイプの計算がより複雑になっていくと予想される。DNAチップの解析に必要なパイオインフォマティックに詳しい人材が眼科の分野でも必要になってきた。

Affymetrix社のGENECHIP™をはじめ、DNAチップで解析できるSNP数も50万個から100万個、さらに200万個と毎年倍々で増加していくことが予想される。これらの測定結果をDNAチップ以外の方法で追試するには膨大な時間と労力が必要であり、単一の眼科施設だけでは将来にわたって解析を継続することは困難である。感覚器センターでは関連施設との共同でオンライン症例情報収集ネットワークを構築し、自動DNA抽出

機を用いて各施設から送られてきた血液からDNAを抽出し、3台のキャピラリーDNA解析装置を使って遺伝子解析までを行う。眼科疾患遺伝子解析センターの準備がほぼ整った。解析結果は参加施設にそのまま報告し、論文として報告していただくことになる。まずは加齢黄斑変性、緑内障、網膜色素変性の疾患を対象に遺伝子解析を開始する予定である。

## VI 今後の課題

今後の課題としては日本における加齢黄斑変性の遺伝情報充実に資することである。今回の補体H因子の解析結果からもわかるように、欧米の遺伝子情報だけでは日本人の遺伝的診断は困難であることは明白である。日本人と欧米人のリスク遺伝子には種類や内容が異なるものが多数存在する可能性があり、アメリカ主導の遺伝子解析研究の結果をそのまま日本人に当てはめることは危険である。感覚器センターを中心とした遺伝子解析サービスは全国の眼科遺伝子研究の起爆剤になればと期待している。2006年6月、厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会は、2007年度から5年間の戦略研究課題として「感覚器戦略研究」を承認した。このなかには加齢黄

斑変性の遺伝子解析による早期診断法の確立なども達成目標として盛り込まれており、今後の遺伝子研究には追い風になることが予想される。ヒトが得る情報の8割は視覚によると考えられ、高齢化が進行する日本において quality of life を維持するためにも加齢黄斑変性の遺伝子研究はますます重要になってきている。

#### 文 献

- 1) Evans JR : Risk factors for age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* **20** : 227-253, 2001
- 2) Allikmets R, Shroyer NF, Singh N et al : Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* **277** : 1805-1807, 1997
- 3) Iyengar SK, Song D, Klein BE et al : Dissection of genomewide-scan data in extended families reveals a major locus and oligogenic susceptibility for age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* **74** : 20-39, 2004
- 4) Abecasis GR, Yashar BM, Zhao Y et al : Age-related macular degeneration : a high-resolution genome scan for susceptibility loci in a population enriched for late-stage disease. *Am J Hum Genet* **74** : 482-494, 2004
- 5) Hageman GS, Mullins RF, Russell SR et al : Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. *FASEB J* **13** : 477-484, 1999
- 6) Mullins RF, Russell SR, Anderson DH et al : 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* **14** : 835-846, 2000
- 7) Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS et al : A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol* **134** : 411-431, 2002
- 8) Crabb JW, Miyagi M, Gu X et al : Drusen proteome analysis : an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 14682-14687, 2002
- 9) Klein RJ, Zeiss C, Chew EY et al : Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* **308** : 385-389, 2005
- 10) Haines JL, Hauser MA, Schmidt S et al : Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* **308** : 419-421, 2005
- 11) Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ et al : Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* **308** : 421-424, 2005
- 12) Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV et al : A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** : 7227-7232, 2005
- 13) Zarepari S, Branham KE, Li M et al : Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* **77** : 149-153, 2005
- 14) Okamoto H, Umeda S, Obazawa M et al : Complement factor H polymorphisms in Japanese population with age-related macular degeneration. *Mol Vis* **12** : 156-158, 2006
- 15) Gotoh N, Yamada R, Hiratani H et al : No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese. *Hum Genet* (in press)
- 16) Gold B, Merriam JE, Zernant J et al : Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* **38** : 458-462, 2006
- 17) Suzuki MT, Terao K, Yoshikawa Y : Familial early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primates* **44** : 291-294, 2003
- 18) Umeda S, Ayyagari R, Suzuki MT et al : Molecular cloning of ELOVL4 gene from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Exp Anim* **52** : 129-135, 2003
- 19) Umeda S, Ayyagari R, Allikmets R et al : Early-onset macular degeneration with drusen in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree : exclusion of 13 candidate genes and loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46** : 683-691, 2005
- 20) Umeda S, Suzuki MT, Okamoto H et al : 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



# Proteomic and Transcriptomic Analyses of Retinal Pigment Epithelial Cells Exposed to REF-1/TFPI-2

Masabiko Shibuya,<sup>1,2</sup> Haru Okamoto,<sup>1</sup> Takehiro Nozawa,<sup>3</sup> Jun Utsumi,<sup>4</sup>  
Venkat N. Reddy,<sup>5</sup> Hirotoshi Echizen,<sup>2</sup> Yasubiko Tanaka,<sup>6</sup> and Takeshi Iwata<sup>1</sup>

**PURPOSE.** The authors previously reported a growth-promoting factor, REF-1/TFPI-2, that is specific to retinal pigment epithelial (RPE) cells. The purpose of this study was to determine the genes and proteins of human RPE cells that are altered by exposure to TFPI-2.

**METHODS.** Human primary RPE cells were cultured with or without TFPI-2. Cell extracts and isolated RNA were subjected to proteomic and transcriptomic analyses, respectively. Proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis followed by gel staining and ion spray tandem mass spectrometry analyses. Transcriptomic analysis was performed using a DNA microarray to detect 27,868 gene expressions.

**RESULTS.** Proteomic analysis revealed c-Myc binding proteins and ribosomal proteins L11 preferentially induced by TFPI-2 in human RPE cells. Transcriptomic analysis detected 10,773 of 33,096 probes in the TFPI-2 treated samples, whereas only 2186 probes were detected in the nontreated samples. Among the genes up-regulated by TFPI-2 at the protein level were *c-myc*, Mdm2, transcription factor E2F3, retinoblastoma binding protein, and the *p21* gene, which is associated with the *c-myc* binding protein and ribosomal protein L11.

**CONCLUSIONS.** The mechanisms by which TFPI-2 promotes the proliferation of RPE cells may be associated with augmented *c-myc* synthesis and the activation of E2F in the retinoblastoma protein (Rb)/E2F pathway at the G1 phase of the RPE cells. Activation of ribosomal protein L11 and the Mdm2 complex of the p53 pathway may be counterbalanced by the hyperproliferative conditions. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:516-521) DOI:10.1167/iov.06-0434

Retinal pigment epithelial (RPE) cells play important roles in maintaining the homeostasis of the retina. RPE cells, located between the sensory retina and the choroidal blood supply, form a diffusion barrier controlling access to the subretinal space, with the RPE membrane regulating the transport

of proteins and controlling the hydration and ionic composition of the subretinal space. The sensitivity and viability of the photoreceptors thus depend on RPE-catalyzed transport activity. Proteins in the RPE cells that function in ionic, sugar, peptide, and water transport have been identified.<sup>1</sup> Damage to RPE cells generally leads to degeneration of the neural retina, as occurs in retinitis pigmentosa and age-related macular degeneration. Transplantation of the healthy retinal pigment cells or embryonic stem cells differentiating into RPE cells would be an ideal therapeutic approach to treat such diseases, and such attempts have been made.<sup>2</sup>

An alternative approach to treat these retinal diseases would be the use of a growth factor that promotes proliferation of the remaining RPE cells in a damaged retina or one that stimulates the regeneration of damaged RPE cells. To find such factor(s), the proteins expressed in human fibroblast cells were fractionated and assayed, leading to the isolation of RPE cell factor-1 (REF-1), which selectively promoted the proliferation of primary human RPE cells.<sup>3</sup>

Subsequently, the cDNA of REF-1 was cloned using information from the N-terminal amino acid sequences, which was identical with the tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2).<sup>3</sup> Earlier studies have shown that TFPI-2 is a Kunitz-type serine protease inhibitor<sup>4-6</sup> involved in the regulation of extrinsic blood coagulation<sup>4,7</sup> and in the proliferation, invasion, and metastasis of various types of malignant cells.<sup>4,8-13</sup> Extensive studies on the physiological roles of TEPI-2 have revealed that the ERK/MAPK pathway<sup>13</sup> may be associated with the up-regulation of the *TFPI-2* gene and that DNA methylation<sup>9,10</sup> in certain tumor cell lines may be related to the downregulation of the *TEPI-2* gene. When TFPI-2 is added to the culture medium of vascular smooth muscle cells, it promotes cell proliferation.<sup>14</sup>

Our initial finding that TFPI-2 enhanced RPE proliferation prompted us to question how this was achieved. We applied proteomic and transcriptomic analyses to screen the changes in the expression of the RNAs and proteins in RPE cells and will show that the proliferation promoting activity of TFPI-2 on RPE cells is associated with the regulation of an oncogene product, *c-myc*, and representative cancer repressor proteins retinoblastoma protein (Rb)/E2F and p53.

## MATERIALS AND METHODS

### TFPI-2 Treatment of Human RPE Cell Culture

Human primary RPE cells (passage 5) were seeded at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells/0.5 mL per well in 24-well plastic plates (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) with Dulbecco modified MEM (DMEM; Invitrogen Japan, Tokyo, Japan) containing 15% fetal calf serum (FCS, Invitrogen). TFPI-2 was added to 20 wells with the RPE cells at 10 ng/mL concentrations and was incubated at 37°C for 24 hours for the proteomic samples, and for 6 hours, 12 hours, and 24 hours for the transcriptomic samples. An equal amount of saline was added to 20 wells containing RPE cells for controls. TFPI-2 was donated by Toray Industries, Inc., Tokyo, Japan.

From the <sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Department of Pharmacotherapy, Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan; <sup>3</sup>Analytical Instrument Division, AMR Inc., Tokyo, Japan; <sup>4</sup>R&D Division, Toray Industries, Inc., Tokyo, Japan; <sup>5</sup>Department of Ophthalmology, Kellogg Eye Center, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan; and <sup>6</sup>International University of Health and Welfare, Mita Hospital, Tokyo, Japan.

Supported in part by a grant-in-aid from the policy-based Medical Services Foundation.

Submitted for publication April 18, 2006; revised July 17, 2006; accepted December 4, 2006.

Disclosure: M. Shibuya, None; H. Okamoto, None; T. Nozawa, AMR Inc. (F); J. Utsumi, Toray Industries, Inc. (F); V.N. Reddy, None; H. Echizen, None; Y. Tanaka, None; T. Iwata, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Takeshi Iwata, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, 2-5-1 Higashigaoka, Meguro-ku, Tokyo 152-8902, Japan; iwataakeshi@kankakuki.go.jp.

## Protein Sample Preparation

To isolate whole cellular protein extracts from cultured RPE cells, the cells were rinsed 3 times with  $1 \times$  PBS (pH 7.4) and were lysed in a denaturing lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris, 0.2% purifier (Bio-Lyte, pH range 3-10; Bio-Rad, Hercules, CA), and 50 mM dithiothreitol (DTT). The collected lysate was then centrifuged at 14,000g for 15 minutes at 4°C. Proteins in the supernatant were repeatedly concentrated and precipitated and finally desalinated (Readyprep 2-D Cleanup kit; Bio-Rad). The protein concentration in the RPE samples was determined by a modified Lowry method adapted for use with the lysis buffer.

## Two-Dimensional Electrophoresis

Protein samples were separated by a two-dimensional electrophoresis method. A 300- $\mu$ g protein sample was loaded on immobilized pH gradient (IPG) strips (pH 3-10, 7 cm; pH 4-7, 17 cm; Bio-Rad) by in-gel rehydration at 20°C overnight. For the 7-cm strip, isoelectric focusing (IEF) was used for the first dimension at an initial voltage of 250 V for 15 minutes, increased to 4000 V for 2 hours, and held until 20,000 V/h was reached. For the 17-cm strip, the initial voltage was set at 250 V, as for the 7-cm strip. Then the voltage was increased to 10,000 V for 3 hours and was held until 60,000 V/h was reached. Immediately after IEF, the IPG strips were equilibrated for 20 minutes in buffer containing 6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris (pH 8.8), and 20% glycerol under a reduced condition with 2% DTT (Bio-Rad), followed by another incubation for 10 minutes in the same buffer under alkylating conditions with 2.5% iodoacetamide (Bio-Rad).<sup>15</sup>

Equilibrated IPG strips were then electrophoresed by SDS-PAGE for the second dimension. Images of the chemiluminescent signals were captured and merged with those of protein spots made visible by protein gel stain (Sypro Ruby; Bio-Rad), and the spots corresponding to the immunoreactivity were cut out. To test reproducibility, the experiment was performed twice.

## Protein Identification by Mass Spectrometry

Excised gel pieces were rinsed with water and then with acetonitrile and were completely dried for the reduction-alkylation step. They were incubated with 10 mM DTT in 100 mM ammonium bicarbonate for 45 minutes at 56°C, then with 55 mM iodoacetamide in 100 mM ammonium bicarbonate for 30 minutes at room temperature in the dark. The supernatant was removed, and the washing procedure was repeated three times. Finally, the gel pieces were again completely dried before trypsin digestion and were rehydrated in a solution of trypsin (12.5 ng/ $\mu$ L; Promega, Madison, WI) in 50 mM ammonium bicarbonate. The digestion was continued for 16 hours at 37°C, and the extraction step was performed once with 25 mM ammonium bicarbonate, then twice with 5% formic acid, and finally with water. After resuspension in 40  $\mu$ L solution of aqueous 0.1% trifluoroacetic acid/2% acetonitrile, the samples were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). For analysis by LC-MS/MS, the tryptic digests were injected by an automatic sampler (HTS-PAL, CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) onto a 0.2  $\times$  50-mm capillary reversed-phase column (Magic C18, 3  $\mu$ m; Michrom BioResources, Inc., Auburn, CA) using an HPLC (Paradigm MS4; Michrom BioResources). Peptides were eluted with a gradient (95% solvent A consisting of 98% H<sub>2</sub>O/2% acetonitrile/0.1% formic acid)/5% solvent B (10% H<sub>2</sub>O/90% acetonitrile/0.1% formic acid; 0 minute)/35% solvent A/65% solvent B (20 minutes)/5% solvent A/95% solvent B (21 minutes)/5% solvent A/95% solvent B (23 minutes)/95% solvent A/5% solvent B (30 minutes) for 30 minutes at a flow rate of 1.5  $\mu$ L/min. Peptides were eluted directly into an ion trap mass spectrometer (ESI; Finnigan LTQ; Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) capable of data-dependent acquisition. Each full MS scan was followed by an MS/MS scan of the most intense peak in the full MS spectrum with the dynamic exclusion enabled to allow detection of less-abundant peptide ions. Mass spectrometric scan events and HPLC solvent gradients were controlled with the use of a computer program (Paradigm Home; Michrom BioResources).

## Total RNA Isolation from RPE Cells

Total RNA was isolated from the cultured RPE cells after 6 hours, 12 hours, and 24 hours with TFPI-2 using a total RNA isolation kit (RNA-Bee-RNA Isolation Reagent; Tel-Test, Friendswood, TX). Total RNA samples were treated with RNase-free DNase (Roche Diagnostics Japan) to minimize genomic DNA contamination.

## DNA Microarray Analysis

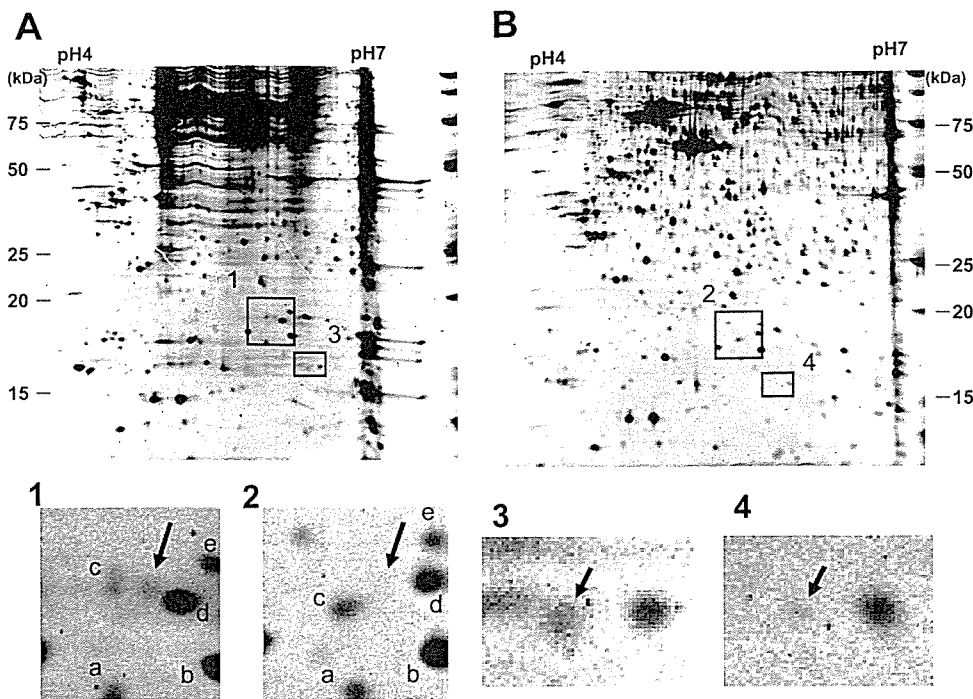
DNA microarray analysis was performed (AB1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA). The survey array used (Human Genome Survey Array; Applied Biosystems) contained 33,096 60-mer oligonucleotide probes representing a set of 27,868 individual human genes and more than 1000 control probes. Sequences used for the microarray probe were obtained from curated transcripts (Celera Genomics Human Genome Database), RefSeq transcripts that had been structurally curated from the LocusLink public database, high-quality cDNA sequences from the Mammalian Gene Collection (MGC; <http://mgc.nci.nih.gov>), and transcripts that were experimentally validated (Applied Biosystems). The 60-mer oligo probes were synthesized using standard phosphoramidite chemistry and solid-phase synthesis and underwent quality control by mass spectrometry. The probes were deposited and covalently bound to a derivatized nylon substrate (2.5  $\times$  3 inches) that was backed by a glass slide by contact spotting with a feature diameter of 180  $\mu$ m and more than 45  $\mu$ m between each feature. A 24-mer oligo internal control probe (ICP) was cospotted at every feature with 60-mer gene expression probe on the microarray. Digoxigenin-UTP labeled cRNA was generated and linearly amplified from 1  $\mu$ g total RNA (Chemiluminescent RT-IVT Labeling Kit, version 2.0; Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Array hybridization (two arrays per sample), chemiluminescence detection, image acquisition, and analysis were performed (Chemiluminescence Detection Kit and AB1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer; Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol.

Briefly, each microarray was first prehybridized at 55°C for 1 hour in hybridization buffer with blocking reagent. Sixteen micrograms labeled cRNA targets were first fragmented into 100 to 400 bases by incubation with fragmentation buffer at 60°C for 30 minutes, mixed with internal control target (ICT; 24-mer oligo labeled with LIZR fluorescent dye), and hybridized to each prehybrid microarray in 1.5 mL vol at 55°C for 16 hours. After hybridization, the arrays were washed with hybridization wash buffer and chemiluminescence rinse buffer. Enhanced chemiluminescent signals were generated by first incubating the arrays with anti-digoxigenin alkaline phosphatase and enhanced with chemiluminescence enhancing solution and chemiluminescence substrate.

Images were collected from each microarray using the 1700 analyzer equipped with a high-resolution, large-format CCD camera, including 2 "short" chemiluminescent images (5-second exposure length each) and 2 "long" chemiluminescent images (25-second exposure length each) for gene expression analysis, two fluorescent images for feature finding and spot normalization, and two quality control images for spectrum cross-talk correction. Images were quantified, corrected for background and spot, and spatially normalized.

## Data Analysis

MS data were identified with the use of a protein search program (BioWorks 3.2; Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). For protein database searches, the same program was used to create centroid peak lists from the raw spectra. These peak lists were then submitted for database searching (BioWorks). The identity of the samples was searched from databases (nrNCBI [[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)]) that extracted proteins and were restructured; search terms included human and *Homo sapiens*. Differentially expressed proteins were further analyzed for related genes and proteins using natural language processing software (Pubgene database; PubGene Inc., Boston, MA) and data mining software of gene expression (OmniViz; OmniViz, Inc., Maynard, MA).



**FIGURE 1.** Two-dimensional gel electrophoresis of human RPE cells culture with (A) and without (B) TFPI-2. Spots corresponding to proteins whose expression is dependent on the presence of TFPI-2 in the culture medium are indicated by the *arrows (insets)*. Proteins were detected by SYPRO Ruby staining. Spots corresponding to the differentially expressed proteins indicated by *arrows* (1 vs. 2 and 3 vs. 4) were subsequently subject to the LC-MS/MS analysis so that proteins could be identified.

## RESULTS

### Proteome Analysis of RPE Cells Treated with TFPI-2

To determine the mechanisms responsible for the proliferation-promoting activity of TFPI-2 on RPE cells, protein synthesis and RNA expression were determined before and after TFPI-2 exposure. Differentially expressed proteins in the primary human RPE cells in response to TFPI-2 were identified by two-dimensional electrophoresis (Fig. 1). Samples were initially separated using IPG at a pH range of 3 to 10 to observe the full distribution of protein spots. The pH range was then narrowed to 4 to 7 to obtain higher resolution for spot picking. Consequently, approximately 480 spots were identified in the whole gel. We then focused on molecular weight less than 25 kDa, which is easy to check for changes. Ten spots considered differentially expressed in the two-dimensional gel were collected and subjected to LC-MS/MS analysis. Among the identified proteins, ribosomal protein L11 (RPL11; Fig. 1-1) and c-Myc binding protein (MYCBP; Fig. 1-3), known for regulating cell proliferation, were identified.<sup>16</sup> These two proteins, identified by LC-MS/MS analysis and data analysis software (BioWorks 3.2), were consistent with those estimated from the results of two-dimensional electrophoresis (Table 1).

### Transcriptomic Analysis of RPE Cells Treated with TFPI-2

The expression of 8134 genes in RPE cells was analyzed using DNA microarray with and without TFPI-2 exposure for 6 hours, 12 hours, and 24 hours. Signal normalization was performed for six independent DNA microarray chips according to the manufacturer's protocol. Genes differentially expressed by

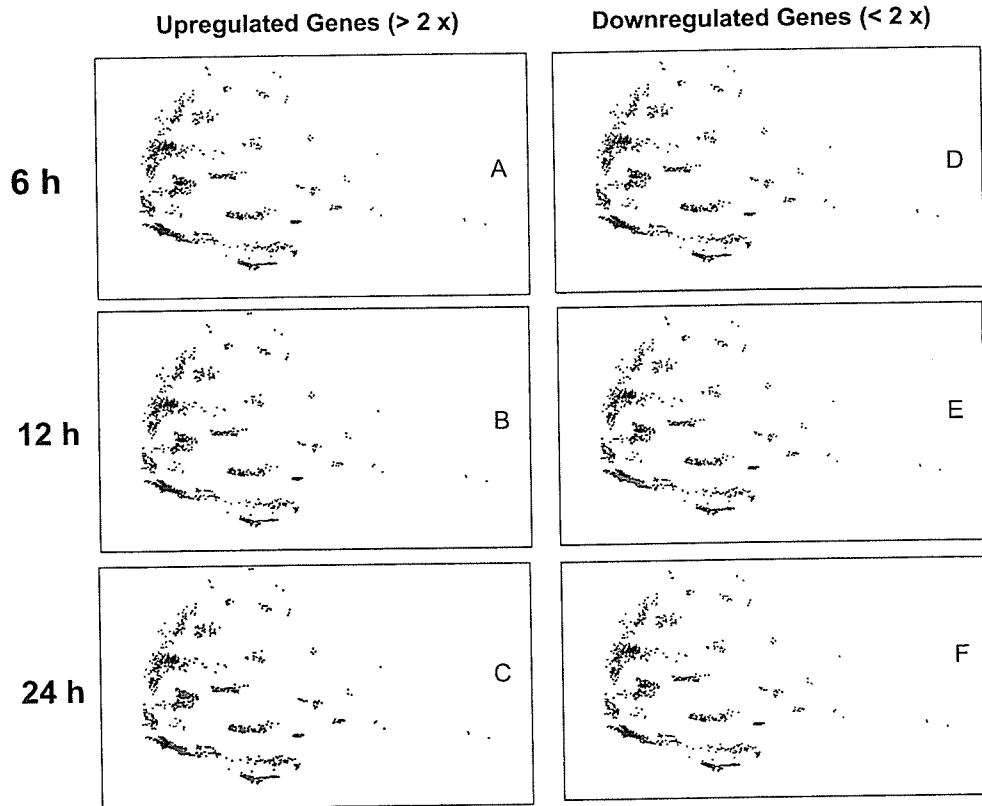
more than threefold were considered significant and were selected for further analysis. Among the 33,096 possible probes, 10,773 probes were detected in the RPE cells incubated with TFPI-2, whereas only 2186 probes were detected without TFPI-2. Based on expression levels at the three time points (6 hours, 12 hours, and 24 hours), the time-dependent expression pattern of each gene was calculated and clustered with other genes with similar expression patterns using data mining software (OmniViz). Data analysis resulted in 38 clusters of genes that either increased or decreased their expression levels by more than twofold after TFPI-2 (Fig. 2). Nineteen genes were upregulated in 5 clusters, 108 genes in 16 clusters, and 717 genes in 22 clusters at 6 hours, 12 hours, and 24 hours, respectively. For downregulated genes, 30 genes in 16 clusters, 119 genes in 19 clusters, and 3 genes in 19 clusters were observed after 6 hours, 12 hours, and 24 hours, respectively. Transcriptomic analysis revealed significantly more genes differentially expressed at the transcriptional level than at the proteome level.

## DISCUSSION

Proteins and genes whose expression was upregulated or downregulated after exposure to TFPI-2 were analyzed in human RPE cells to study the proteomic and transcriptomic changes. Protein and gene expression profiles for human RPE cells have been reported by West et al.,<sup>17</sup> who identified 278 proteins, and Cai et al.,<sup>18</sup> who reported  $5580 \pm 84$  genes expressed in adult human RPE and ARPE19 cell lines using a DNA chip with 12,600 probes (Human U95Av2; Affymetrix, Santa Clara, CA). Our study showed changes in the expression of 8134 of 27,868 genes. DNA microarray analyses were simul-

**TABLE 1.** Two-Dimensional Gel Spots Identified by Mass Spectrometry

Protein	Number of AA	Peptide Residues	Identified Peptide from Database	MW	Score	Accession Number
c-Myc binding protein	167	108-117	TAEDAKDFFK	18642.6	10.13	1731809
Ribosomal protein L11	177	88-94	VREYELR	20125.1	20.21	14719845



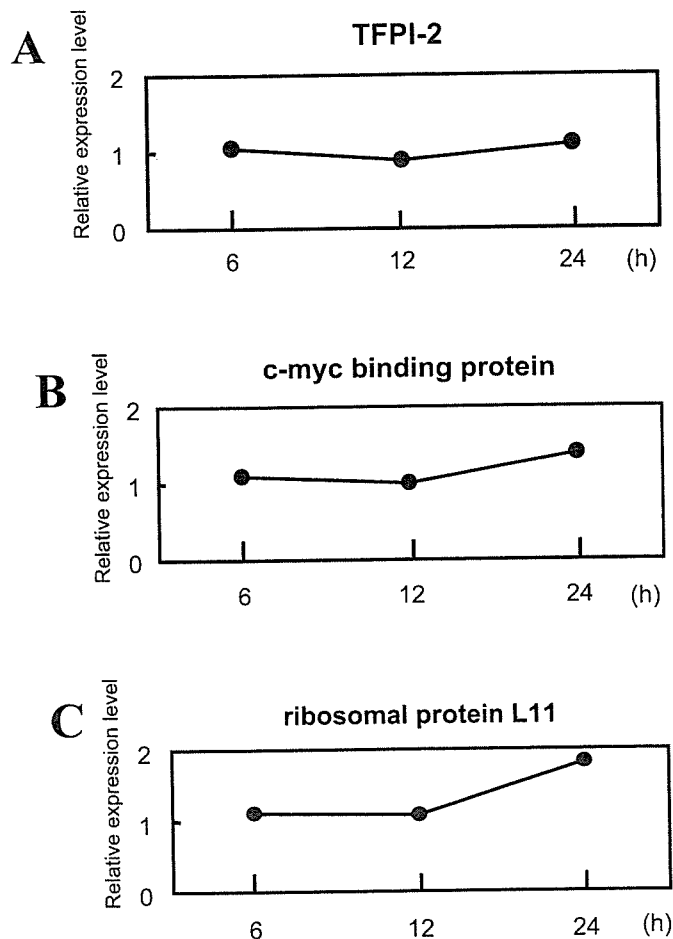
**FIGURE 2.** Differentially expressed genes detected by DNA array are plotted as clusters. Differentially expressed genes whose expression level was increased by more than twofold (A–C) or was reduced by more than 0.5-fold (D–F) in RPE cells treated with TFPI-2 at incubation times of 6 hours, 12 hours, and 24 hours compared with the control cells are shown. Expression profile analysis revealed different gene expression patterns at each incubation time.

taneously performed at three time points (6 hours, 12 hours, and 24 hours) to monitor the course of expression of the possible 27,868 genes in human RPE cells exposed and not exposed to TFPI-2. This study was conducted at the translational and the transcriptional levels to complement the disadvantages of each method.

Raw gene expression data were further analyzed with data mining software (OmniViz) to obtain an overall picture of the transcriptional changes induced by TFPI-2 in human primary RPE cells. Genes whose expressions were changed by more than twofold were clustered into 38 groups showing a change of expression at each time point (Fig. 2). The number of genes upregulated at each time point was considerably higher than the number that was downregulated. A small number of genes was triggered by TFPI-2 treatment at 6 hours, before the major changes occurred at 24 hours. Among the initially upregulated genes were reticulon 4 interacting protein 1, phospholipase C, delta 1, granzyme M (lymphocyte met-ase 1; *GZMM*), and mitochondrial ribosomal protein L41 (*MRPL41*).

Proteomics analysis simultaneously performed at 24 hours identified two differentially expressed proteins, the *c-myc* binding protein (MYCBP) and the ribosomal protein L11 (RPL11). MYCBP and RPL11 (Fig. 3) are well known to regulate cell cycling through the Rb/E2F pathway and the p53 pathway, respectively. MYCBP stimulates *c-myc* transcription through the retinoblastoma protein (Rb)/E2F pathway (see Fig. 5). Sears et al.<sup>19</sup> reported that activation of Myc increased the signal transduction of the cyclin D/cdk4 and cyclin E/cdk2 pathways. Activation of these pathways inactivates Rb after phosphorylation and E2F dissociation, which then promotes RPE cells to go into the S-phase of the cell cycle. The twofold transcriptional increase of *Rb* and *E2F3* in TFPI-2 exposed cells compared with control at 24 hours supports this hypothesis (Figs. 4C, 4F).

Concomitantly, the expressions of Rb and Mdm2 were up-regulated twofold in growth-stimulated cells compared with control cells. Because Rb is associated with the negative regulation of the G<sub>1</sub>-phase of the cell cycle, the enhanced expres-



**FIGURE 3.** Time course of gene expression for TFPI-2 (A), *c-myc* binding protein (B), and ribosomal protein L11 (C) in the cultured human RPE cells after exposure to TFPI-2.