

厚生労働科学研究費補助金感覚器障害研究事業

緑内障の危険因子の解明による診断法の開発、緑内障マウスを用いた
視神経保護薬の開発と予防・治療法への応用

平成19年度研究報告書

平成20年3月

主任研究者 岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター

臨床研究センター（感覚器センター）

<http://www.kankakuki.go.jp>

目次

I. 総括研究報告

緑内障の危険因子の解明による診断法の開発、緑内障マウスを用いた
視神経保護薬の開発と予防・治療法への応用

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・部長

三宅 養三

愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻・教授

山本 哲也

岐阜大学医学部眼科・教授

溝田 淳

順天堂大学医学部浦安病院眼科・准教授

村上 晶

順天堂大学医学部眼科・教授

西村 俊秀

東京医科大学臨床プロテオームセンター・客員教授

石田 成弘

参天製薬（株）開発研究センター・主任研究員

II. 研究成果

緑内障の危険因子の解明による診断法の開発、緑内障マウスを用いた

視神経保護薬の開発と予防・治療法への応用

班員名簿（平成20年3月現在）

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	部長
分担研究者	三宅 養三 山本 哲也 溝田 淳 村上 晶 西村 俊秀 石田 成弘	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻 岐阜大学医学部眼科 順天堂大学医学部浦安病院眼科 順天堂大学医学部眼科 東京医科大学臨床プロテオームセンター 参天製薬（株）開発研究センター	教授 教授 准教授 教授 客員教授 主任研究員
事務局	涌井 笑子	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） 分子細胞生物学研究部 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL/FAX (03)3411-1026	秘書
経理事務担当	関口 実直	国立病院機構東京医療センター 事務部管理課 TEL 03-3411-0379 FAX 03-3411-0185 nisojimu@ntmc.hosp.go.jp	係長

I. 総括研究報告

緑内障の危険因子の解明による診断法の開発、緑内障マウスを用いた

視神経保護薬の開発と予防・治療法への応用

総括研究報告書

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	部長
分担研究者	三宅 養三	愛知淑徳大学医学福祉部	教授
分担研究者	山本 哲也	岐阜大学医学部眼科	教授
分担研究者	溝田 淳	順天堂大学医学部浦安病院眼科	准教授
分担研究者	村上 晶	順天堂大学医学部眼科	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
分担研究者	石田 成弘	参天製薬（株）開発研究センター	主任研究員

研究要旨：緑内障の危険因子として遺伝因子の強い関与が考えられる。我々は緑内障患者に特有の遺伝子多型を網羅的に解析し、統計学的に優位な緑内障感受性遺伝子を複数発見した。何れもまだ緑内障との関連が報告されていない遺伝子群である。また、これまでに先天性緑内障遺伝子として発見されたオプチニューリン(OPTN)とWDR36について遺伝子改変マウスを作製したところ、緑内障の特徴を表現型とするマウスが誕生した。また、2つの遺伝子をノックアウトしたマウスを作製したところ、牛眼に類似する症状を発症するマウスが開発された。緑内障患者の遺伝的体質である感受性遺伝子の解明と、その表現型である疾患動物モデルの開発に成功したことにより、今後はその2点間にあたる発症経路の解明を両方向から攻めて、早期診断法と予防法の開発に力を注ぎたい。

A. 研究目的

緑内障は遺伝子、環境、習慣、加齢など複数の因子によって発症する多因子疾患と考えられている。緑内障患者の遺伝的体質が明らかになれば、早期診断や予防の道が開かれる。国際ハプロタイプ・プロジェクトなどの遺伝学的研究から白人、東洋人、黒人の遺伝的背景は異なっており、欧米人のデータをそのまま日本人に当てはめることができない。すなわち、日本人の緑内障遺伝子解明には日本人の患者のDNAが必要である。今回我々は多施設共同研究によって収集した開放隅角緑内障患者のDNAを200検体収集し、その中から100検体を抽出して、Affymetrix GeneChip 500Kを用いたGenome Wide Association Studyを行った。個々のDNAについて50万種類の遺伝子多型(SNP)を解析し、100名の対照群と比較した。

遺伝的因子が解明されても発症のタイミングを予測することは困難である。発症する前に蛋白レベルで予測することが可能か試みる実験を行った。多くの眼科疾患では発症前の患者の眼球内から体液をサンプリングすることは困難であり、血漿組成に注目して、その微量成分の変化を検出することにした。

また、緑内障研究においてこれまで困難とされてきた開放隅角緑内障の動物モデルの作製を試みた。我々はこれまでに開放隅角緑内障遺伝子として報告されているミオシリン(MYOC)、オプチニューリン(OPTN)、WDR36について検討したが、米国でのMYOCマウスの失敗を聞き、OPTNとWDR36に集中することにした。緑内障遺伝子改変マウスは緑内障患者と同様な神経線維の萎縮から始まり、神経節細胞死、神経乳頭の陥凹が観察された。このマウスモデルは開放隅角緑内障の発症機序

の解明に役立つだけでなく、視神経保護薬や治療薬をスクリーニングするためのパイオアッセイ系として利用することができる。本研究事業ではこれらのマウスについて視神経保護薬として可能性のある神経栄養因子やヒストン・デ・アセチレーズの阻害剤、フリーラジカル関連薬剤、免疫抑制剤、グルタチオン亢進薬などによる視神経保護薬の効果を検討する。動物モデルにおける薬効の評価系の確立に取り組み、眼球サイズの大きなラットの遺伝子改変や霊長類を用いたドラッグデリバリー法の開発行う。

B. 研究方法

1) 緑内障感受性遺伝子の解明と早期診断法の確立:

開放隅角緑内障患者とコントロールのDNA検体をそれぞれ200検体収集した。この多施設共同研究には国立病院機構、岐阜大学医学部眼科教室、順天堂大学医学部眼科教室、順天堂大学医学部浦安病院眼科が参加した。収集DNA検体の内、それぞれ100検体の合計200検体について個々にAffymetrix社のGeneChip 500Kを用いて50万種類のSNPを分析した。SNPチップのシグナルは患者(100人)とコントロール(100人)間で比較された後、統計処理が行われ、統計学的に緑内障に優位な遺伝子多型(SNP)を明らかにする。本研究では日本人の緑内障患者における遺伝子背景を調査することにより、欧米人とは異なるリスクの高い遺伝子変異や遺伝子多型が発見される可能性がある。

2) 緑内障早期診断のための血漿プロテオーム解析:

全ての疾患において血漿組成の微量変化が予想されている。感受性遺伝子の遺伝子多型に加えて、緑内障の早期診断に利用できる情報として、血漿蛋白組成(血漿プロテオーム)の変化に注目した。開放隅角緑内障患者の血漿50検体とコントロールの50検体について4種類の分画法を使い、イオントラップ型質量分析計(LC-MS/MS)によってタンパク質の同定を行った。血漿中

には分子量5万ダルトンを越える22種類の蛋白が重量比で99%を占めており、これらの主蛋白を東レ株式会社と共同開発中の血漿低分子蛋白分画装置を使って除去した。低分子分画は逆相クロマトグラフィーでさらに分画され、トリプシン処理を行った後にイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーで2次的に分画され、質量分析計で蛋白質の同定を行った。質量分析スペクトグラムは2種類の蛋白同定ソフトウェア(BioWorks, Phenix)によって解析し、両ソフトでリストされた蛋白を緑内障患者と健常者間で比較検討した。

3) 3つの開放隅角緑内障遺伝子の詳細な機能解析と遺伝子変異による機能への影響の解明:

単一の遺伝子の変異による開放隅角緑内障の原因遺伝子としてMYOC、OPTN、WDR36の3遺伝子が発見されており、本研究ではこの中でも最も発症頻度の高いMYOC、正常眼圧力緑内障に関係するOPTN、そしてWDR36の機能解析研究をおこなった。MYOCは毛様体から房水中に分泌されることが知られているが、その機能は明らかにされていない。MYOCの発現・精製は難しく、きわめて不安定であるために、COS-7細胞で強制発現を行い、培養液中に分泌されたMYOC分子を複数の培養細胞に加えて細胞膜蛋白との相互作用を検討した。OPTNについては抗体を作製し、細胞内局在を調べた。また、緑内障患者で発見された遺伝子変異によってOPTNと蛋白相互作用への影響を調べる。WDR36は現在も仮想遺伝子としてその機能は未知のままである。抗体作製などにより、網膜内での局在を調べた。

4) 開放隅角緑内障マウスを用いた発症機序の解明と神経保護薬の開発:

我々はこれまで困難とされてきた進行性の開放隅角緑内障マウスの作製をヒト緑内障遺伝子(OPTN, WDR36)の改変によって作製した。正常眼圧緑内障患者の一部に観察されるOPTN変異体(E50K)を強制発現しており、緑内障の特徴である神経線維層の萎縮から始まり、神経節細胞死、

視神経乳頭の陥凹が観察された。接触型と非接触型の眼圧測定法で疾患マウスを測定した結果、何れも正常な14mmHgの眼圧を維持している。このマウスモデルは正常眼圧緑内障の発症機序の解明に役立つだけでなく、予防薬や治療薬を試験するためのバイオアッセイ系として利用することができる。

本研究ではOPTN遺伝子にとってE50Kよりも大きな障害となる3アミノ酸欠損やモチーフ欠損マウスを作製中で、より重篤な緑内障マウスモデルをめざす。さらに、WDR36遺伝子改変マウスも同様な手法で作製し、OPTNマウスとの表現型の比較を行った。これらのマウスは視神経保護薬として可能性のある神経栄養因子やヒストン・デ・アセチラーゼ、フリーラジカル関連薬剤、免疫抑制剤、グルタチオン亢進薬などの薬効についてその評価系として利用する計画である。主に神経節細胞の生死を基準にした数値化が可能な評価系の確立をめざす。さらに、眼球の大きなラットや霊長類モデルへと移行して、マウスでは困難な眼球内へのドラッグデリバリー法についても検討したい。

C. 研究結果

1) 緑内障感受性遺伝子の解明と早期診断法の確立：

多施設共同研究で収集された開放隅角緑内障患者DNAはAffymetrix社のGeneChip 500Kを用いて遺伝子多型解析が行われ、患者とコントロール間で比較された。この結果、緑内障患者に統計学的優位なSNP群を複数発見した。これらのSNPはp値 10^{-5} - 10^{-5} の信頼度で検出されており、遺伝子座も異なっている。最もp値の低いSNP群が相関している領域に2つの遺伝子が存在するが、その一つは多数のアミノ酸置換をとともうSNPが報告されており、これらのSNPについては全てを解析したところ、その一つに強く相関した。我々はこのSNPを日本人開放隅角緑内障の最も重要なSNPと位置づけられる。相関する遺伝子はこれまでに緑内障との関係が報告されておらず、今後の機能解析が期待される。これら遺伝子群については特許出願中である。

2) 緑内障早期診断のための血漿プロテオーム解析：

遺伝子多型解析による感受性遺伝子の発見に加え、患者の血漿蛋白を疾患バイオマーカーとして利用するための分析を行った。東レ(株)が開発した低分子量分画装置を用いて個々の患者とコントロールの血漿検体について50kDa以下の蛋白を分離し、さらに逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーによって細かく分離され、イオントラップ型質量分析計を用いて蛋白の同定が行われた。その結果、緑内障患者に特有の蛋白が複数同定された。この結果は特許出願された。質量分析計には定量機能が無いために、同定蛋白について抗体が入手可能なものについてはウエスタンブロット法によって比較定量を行っている。感受性遺伝子と血漿成分についても相関があるか検討中である。

3) 4つの既知緑内障遺伝子の詳細な機能解析と遺伝子変異による機能への影響の解明：

優勢遺伝型の開放隅角緑内障原因遺伝子MYOCは隅角に分泌されるタンパク質である。分泌後の機能については不明である。我々はMYOCが結合できる細胞を求めてまずはCOS-7細胞中で強制発現し、分泌されたMYOC分子を他の細胞培養液中加入して細胞膜との結合を観察した。その結果、コンフルエント状態のNIH3T3細胞膜に結合することを発見した。その他の細胞には結合せず、疎に培養されているNIH3T3細胞に対しても結合しなかった。蛋白架橋剤によってMYOCと結合する蛋白を捕らえる実験を行っているが、まだ同定にはいたっていない。

MYOC、OPTN、WDR36の蛋白構造を明らかにすることは、機能解明や薬の開発に貴重な情報をもたらす。我々はMYOC及びOPTNの結晶化を行うために発現法と精製法を確立したが、結晶化に苦戦しており、まだ結晶を得ていない。結晶化が実現されれば北海道大学の稲垣先生等と共同でX線結晶解析装置によって蛋白構造を明らかにする予定である。

正常眼圧緑内障の原因遺伝子として発見

されたオプチニューリン (OPTN)は複数の蛋白質と相互作用することが明らかにされており、重篤な E50K 変異が Rab8 蛋白との結合部位であることから、我々は水晶発振子などをつかって OPTN-Rab8 の蛋白相互作用を計測してきた。E50K 変体は Rab8 との相互作用ができないために細胞内での小胞体輸送系が障害されると考えられる。抗 OPTN 抗体による免疫染色法によって Rab8 との局在は一致する場合が観察されている。網膜神経節細胞株 (RGC5) を使った E50K 変異体の強制発現によって細胞内オルガネラの変化が期待されたが、光学顕微鏡レベルでは異常や細胞死は観察されなかった。

最も新しい緑内障遺伝子 WDR36 は WD ドメインを蛋白中央に持つ WDR ファミリーの一つである。WDR は仮想遺伝子としてその機能は未知のままである。抗 WDR36 抗体を作製し、眼球内での局在を調べた結果、神経節細胞層や内顆粒層、網膜色素上皮細胞に特に多く発現しており、毛様体上皮にも高発現が観察された。房水産生との関連性を検討中である。

4) 正常眼圧緑内障マウスを用いた発症機序の解明と神経保護薬の開発:

OPTN (E50K) と WDR36 (D658G) を強制発現したマウスを複数系統作製した。これらのマウスには緑内障の特徴である視神経萎縮、神経節細胞死、視神経乳頭の陥凹が観察された。また、E50K 変異体が網膜全体を含む全身で発現しているにもかかわらず、網膜神経節細胞の特異的な細胞死が観察できた。WDR36 については OPTN よりも重篤なマウスが生まれた。OPTN が発症までに 12ヶ月ほどかかるのに対して WDR36 は 2ヶ月ほどで発症している。2種類の眼圧測定計を使ってマウスの眼圧を測定した結果、全てのマウスでほぼ 14mmHg を維持していた。眼圧の測定は午前 9-正午の間で行われた。逆走蛍光標識によって生存する神経節細胞数を測定した結果、E50K 変異体マウスは生後 1年間で細胞数が約 5%減少することが明らかにされた。

5) 牛眼マウスの作製

2遺伝子のダブルノックアウトによって牛眼を発症するマウスを作製した。生後 3週

より隅角が閉塞し、13週まで眼圧が上昇、眼球の大きさが体積で最大 10倍まで膨張した。眼球の膨張にしたがい、網膜は伸展し、網膜細胞全体の萎縮が観察された。2つの遺伝子は神経走行性や眼圧調整に関与している可能性があり、現在これらの遺伝子の下流及び上流のシグナル伝達系を探索中である。

D. 考察

緑内障の有病率は岐阜県多治見市と日本緑内障学会が中心となって行った疫学調査 (多治見スタディー) によって、40歳以上で約 5.0% に、70歳以上では 14% と高い発症率であることが明らかにされた。さらに開放隅角緑内障患者の約 9割が正常眼圧緑内障と報告され、アメリカ人の 26% と比べても大差であることが明らかとなった。このことは日本人緑内障患者が欧米人患者と異なる遺伝背景であると考えられる。日本人の緑内障に関係する危険因子を発見し、日本人のための発症前診断が可能になれば、早期に予防が開始できて、発症を未然に防ぐことや、発症の時期を遅らせることが可能となる。

我々は緑内障患者に優位に存在する遺伝子多型及び血漿蛋白を同定することに成功した。緑内障は多因子疾患であると考えられていることから、感受性遺伝子間の関係を患者の病態や血漿蛋白との関係で検討する必要がある。これまでに報告されてきた優勢遺伝型単一緑内障原因遺伝子 (MYOC、OPTN、WDR36) は今回の遺伝子リストに全く現れなかったことは、日本人の緑内障の多くは感受性遺伝子によって発症のリスクが高まっていると考えられる。感受性遺伝子の隅角や網膜における局在や遺伝子欠損マウスの作製が次の目標である

単一緑内障遺伝子としてすでに報告されている MYOC、OPTN、WDR36 の 3遺伝子についてはその生理機能は不明である。我々は MYOC が毛様体から分泌されてどのように機能するのか明らかにすることによって、MYOC が眼圧調整に関連する分子であるか明らかにしたいと考えている。今回の実験から MYOC は密な NIH3T3 細胞表明に結合できることを発見し、結合相手の蛋

白を明らかにし、隅角内での局在が明らかになれば、MYOC の変異によって眼圧が上昇するメカニズムが明らかにされる可能性がある。

正常眼圧緑内障の原因遺伝子として発見されたOPTNは複数の蛋白質と相互作用することが明らかにされており、重篤なE50K 変異が Rab8 蛋白との結合部位であることから、我々は水晶発振子などをつかってOPTN-Rab8 の蛋白相互作用を検討してきた。Rab8 は細胞内の小胞体輸送系に関与しており、神経節細胞死との関係を明らかにしたい。

新しい緑内障遺伝子WDR36はWDドメインを蛋白中央に持つWDRファミリーの一つで仮想遺伝子としてその機能は未知のままである。我々は他のWDR蛋白について蛋白構造を調べた結果、明らかにされているのは蛋白中央部のWDドメインだけであることを知った。蛋白構造解析プログラム(日立BioPackage)をつかってWDR36のWDドメインを構造計算のみできれいに構築することができた。しかし、N末端やC末端の構築には失敗している。両末端については部分発現と精製によって北海道大学稲垣研究室でNMRによる構造解析を行っている。

我々はOPTNとWDR36遺伝子改変マウスを作製し、神経節細胞保護薬のアッセイ系を確立することによって薬効評価を数値化できるように研究している。OPTNとWDR36については1アミノ酸置換に加えてより障害された遺伝子を発現することによって、より重篤な緑内障を早い時期に発症するマウスの作製を試みている。作製されたマウスについて視神経保護薬として可能性のある神経栄養因子、ヒストン・デ・アセチレース、フリーラジカル関連薬剤、免疫抑制剤、グルタチオン亢進薬などの投与によって神経節細胞の保護が可能であるか検討する。

E. 結論

我々は緑内障患者に特有の遺伝子多型を網羅的に解析した結果、統計学的に優位なリスク遺伝子を複数発見した。何れもまだ緑内障との関連が報告されていない遺伝子

群であり、今後の機能解析が期待される。また、これまでに先天性緑内障遺伝子として発見されたオプチニューリンとWDR36について遺伝子改変マウスを作製したところ、緑内障の特徴を発現するマウスが誕生した。緑内障研究において発症の始点となるリスク遺伝子の解明とその結末である動物モデルの開発に成功したことにより、今後はその2点の中間にあたる発症機序の解明に力を注ぎたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shibuya M, Okamoto H, Nozawa T, Utsumi J, Reddy VN, Echizen H, Tanaka Y, and Iwata T. Proteomic & Transcriptomic Analyses of Retinal Pigment Epithelial Cells Exposed to REF-1/TFPI-2, a Growth Promoting Factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 48:516-521.

Hewitt AW, Bennett SL, Richards JE, Dimasi DP, Booth AP, Inglehearn C, Anwar R, Yamamoto T, Fingert JH, Heon E, Craig JE, Mackey DA. Myocilin Gly252Arg mutation and glaucoma of intermediate severity in Caucasian individuals. *Arch Ophthalmol*. 2007 125:98-104.

Okamoto H, Umeda S, Obazawa M, Minami M, Noda T, Mizota A, Honda M, Tanaka M, Koyama R, Takagi I, Sakamoto Y, Saito Y, Miyake Y, and Iwata T. Complement Factor H Polymorphisms in Japanese Population with Age-Related Macular Degeneration. *Mol Vis* 2006 12:156-158.

Yoshida T, DeWan A, Zhang H, Sakamoto R, Okamoto H, Minami M, Obazawa M, Mizota A,

- Tanaka M, Saito Y, Takagi I, Hoh J, Iwata T. HTRA1 Promoter Polymorphism Predisposes Japanese to AMD. *Mol Vis* 2007 13:545-548.
- Hewitt AW, Bennett SL, Richards JE, Dimasi DP, Booth AP, Inglehearn C, Anwar R, Yamamoto T, Fingert JH, Heon E, Craig JE, Mackey DA. Myocilin Gly252Arg mutation and glaucoma of intermediate severity in Caucasian individuals. *Arch Ophthalmol*. 2007 Jan;125(1):98-104.
- Yamamoto T; Carteolol Long-acting Formulation Study Group. [Ocular hypotensive effect of 1% carteolol long-acting eye drops- a double-masked, randomized phase III study in ocular hypertension or primary open-angle glaucoma patients comparing long-acting carteolol eye drops vs. current product] *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2007 Jun;111(6):463-72.
- Sawada A, Aoyama A, Yamamoto T, Takatsuka N. Long-term therapeutic outcome of acute primary angle closure in Japanese. *Jpn J Ophthalmol*. 2007 Sep-Oct;51(5):353-9.
- Hatano N, Mizota A, Tanaka M. Vitreous surgery for diabetic macular edema--its prognosis and correlation between preoperative systemic and ocular conditions and visual outcome. *Ann Ophthalmol (Skokie)*. 2007 Sep;39(3):222-7.
- Nakajima H, Mizota A, Tanaka M. Technical note: method for estimating volume of subretinal fluid in cases of localized retinal detachment by OCT ophthalmoscopy. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2007 Sep;27(5):512-7.
- Mizota A, Sakuma T, Miyauchi O, Honda M, Tanaka M. Measurement of retinal thickness from three-dimensional images obtained from C scan images from the optical coherence tomography ophthalmoscope. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2007 Apr;35(3):220-4.
- Ebihara N, Chen L, Tokura T, Ushio H, Iwatsu M, Murakami A. Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res*. 2007;39(3):155-63.
- Kondo M, Ueno S, Piao CH, Miyake Y, Terasaki H. Comparison of focal macular cone ERGs in complete-type congenital stationary night blindness and APB-treated monkeys. *Vision Res*. 2008 Jan;48(2):273-80.
- Terauchi N, Fujinami K, Shinoda K, Tsunoda K, Hanazono G, Miyake Y, Inomata K. Transient macular dysfunction determined by focal macular electroretinogram. *Br J Ophthalmol*. 2007 Dec;91(12):1709-10.
- Ikenoya K, Kondo M, Piao CH, Kachi S, Miyake Y, Terasaki H. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes of patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Jul;48(7):3312-7.
- Hanazono G, Tsunoda K, Shinoda K, Tsubota K, Miyake Y, Tanifuji M. Intrinsic signal imaging in macaque retina reveals different types of flash-induced light reflectance changes of different origins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Jun;48(6):2903-12.
- Yasukawa T, Wiedemann P, Hoffmann S, Kacza J, Eichler W, Wang YS, Nishiwaki A, Seeger J, Ogura Y. Glycoxidized particles mimic lipofuscin accumulation in aging eyes: a new age-related macular degeneration model in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007 Oct;45(10):1475-85.

2. 出版物

Takeshi Iwata and Stanislav Tomarev. Animal Models for Eye Diseases and Therapeutics, Source Book of Biomedical Research, Humana Press Inc. (2008)

Takeshi Iwata. Complement Activation of Drusen in Primate Model (*Macaca fascicularis*) for Age-Related Macular Degeneration. Innate Immunity, Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science + Business Media, LLC. (2008)

岩田岳、網膜・硝子体のプロテオーム解析、日本の眼科 78:577-582 (2007)

岩田岳、緑内障の動物モデル (1) あたらしい眼科 24:909 (2007)

岩田岳、緑内障の動物モデル (2) あたらしい眼科 24:1049 (2007)

3. 学会

(学会一般演題)

111 回日本眼科学会総会 (大阪、2007) 岩田岳、渋谷昌彦、岡本はる、野沢壮宏、内海潤、Reddy Venkat、田中靖彦。トランスクリプトーム及びプロテオームの比較による網膜色素上皮細胞増殖因子 TFPI-2 の機能解析

111 回日本眼科学会総会 (大阪、2007) 吉田統彦、Andrew DeWan、岡本はる、皆見政好、尾羽沢実、溝田淳、本田美樹、斉藤義博、高木郁江、フォジョセフィー、岩田岳。加齢性黄斑変性症の危険因子としての HTRA1 プロモーター遺伝子多型の解析

Human Proteome Organization 6th Annual World Congress (Seoul, Korea 2007) H Okamoto, S Umeda, T Nozawa, MT Suzuki, K Terao, Y Yoshikawa, T Iwata. Comparative proteome analysis of macula versus peripheral retina in cynomolgus monkey.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (Fort Lauderdale, Florida, USA 2007) T Yoshida, K Fujinami, K Shinoda, Y Miyake, MT Suzuki, K Terao, Y Yoshikawa, T Iwata. Focal Macular Electroretinogram of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) with Early Onset Macular Degeneration.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (Fort Lauderdale, Florida, USA 2007) H Okamoto, S Umeda, T Nozawa, MT Suzuki, K Terao, Y Yoshikawa, Y Miyake, T Iwata. Comparative proteome analysis of macula versus peripheral retina in cynomolgus monkey.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (Fort Lauderdale, Florida, USA 2007) M Minami, T Iwata Interaction of secreted MYOC and the cell surface protein on NIH3T3 cells.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (Fort Lauderdale, Florida, USA 2007) M Akahori, N Inoue, M Obazawa, M Minami, H Okamoto, Y Miyake, T Iwata. Identification of Glaucoma Associated SNPs using SNP Microarray.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1 特許

(緑内障の血漿プロテオーム)

特願 2008-092245

特願 2008-091522

特願 2008-092021

(遺伝子多型解析)

出願中

2 実用新案登録 なし

3 その他 なし

II. 研究成果

85. 緑内障の動物モデル (1)

— 霊長類モデル, ラットモデル —

岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター
臨床研究センター(感覚器センター)
分子細胞生物学研究部門

緑内障研究において動物モデルの存在はきわめて重要である。現在はおもに霊長類に加えてラットやマウスなどの齧歯(げっし)類が利用されている。本セミナーでは緑内障で利用されている動物モデルについて、2回シリーズで紹介したい。

はじめに

動物モデルの利点は、隅角や視神経・網膜における変化を発症過程に沿って詳細に解析できること、さらに新薬の評価を行えることである。これまでも複数の哺乳類やその他の種で動物モデルの探索や開発が行われてきた¹⁾。利用目的に応じて1)ヒトとの視覚形態の類似性、2)発症までの時間、3)遺伝子操作の可能性、4)モデル動物作製に必要な技術、5)眼球の大きさ、6)解析に必要な技術、7)モデル動物の有効性、8)動物の維持費用などの検討が必要である。これまでも異なる種で自然発症した緑内障モデル動物が紹介されているが、一般的には手術的あるいは遺伝子改変によって作製されたモデル動物が利用されている。

● 霊長類モデル

すべての動物モデルのなかで隅角や視神経乳頭の構造がヒトと最も類似する霊長類モデルが研究に適していることはいうまでもないことである。特に房水流出機構に関する研究においては貴重な存在である。しかし、1頭当たりの維持費用がマウスの約100倍かかることや、飼育・管理に高度な知識・技術が必要であることから、多くの研究では利用されていない。房水流路の遮断にはおもに線維柱帯の光凝固が利用される^{2,3)}。この手法によって手術後数日間で25~60 mmHgの眼圧上昇が期待できる。その他の手法としては前房内に赤血球⁴⁾、ラテックス⁵⁾、ポリアクリルアミドゲル⁶⁾、ステロイド⁷⁾を注入することによって眼圧上昇を促す方法が報告されているが、光凝固によって最も安定した眼圧上昇が得られている⁸⁾。霊長類における眼圧上昇は視神経乳頭、網膜神経線維、網膜神経節細胞層に障害⁹⁾をもたらす、ヒトと同様な病理学的所見が再現されることが確認されている。また、霊長類モデルを利用した、光凝固後30日に

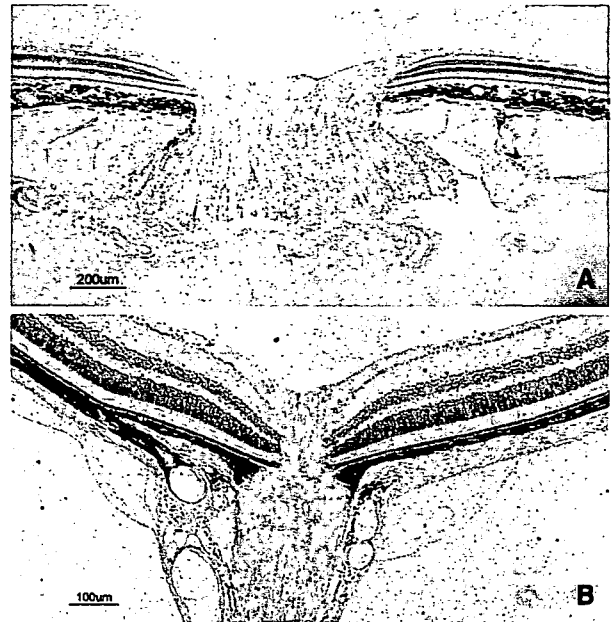


図1 カニクイザルとマウスの視神経乳頭の比較
カニクイザル(A)の視神経乳頭の構造はヒトときわめて類似しており、マウス(B)のそれとは大きく異なる。

における網膜内の遺伝子発現の研究も報告されており¹⁰⁾、この情報は新しい治療薬の開発にも利用されている。

● ラットモデル

動物モデルを用いて薬効評価を行う場合、実験には多数の動物が必要になる。このような場合にラットは有効である。ラットは簡単に飼育でき、性質もおとなしく、眼球も手ごろな大きさであることから、市販の機器を使って麻酔なしで眼圧測定ができる¹¹⁾。ラットの眼球には緑内障に関係する部位がすべて存在する。ラットにおける眼圧上昇は強膜静脈への生理食塩水の注入¹²⁾、インドインクを使った線維柱帯の光凝固¹³⁾、線維柱帯の光凝

固¹⁴⁾、強膜静脈の焼灼¹⁵⁾などの方法が用いられるが、研究者には高い技術が求められる。この方法によって最大約2倍眼圧上昇を急激に起こすことができる。眼圧上昇は通常数週間持続し、さらに2回目の光凝固が行われると、3週間以上の持続も可能である。眼圧上昇によってヒトに類似する網膜神経線維の萎縮や視神経乳頭の変化が観察できる^{16,17)}。ラットモデルの登場によって、眼圧上昇に伴う電気生理学的な研究や神経保護薬の開発、豊富な網膜の材料を使った遺伝子解析なども可能になった。眼圧が25~45 mmHgに上昇するRCS (Royal College of Surgeons) ラットも発見されており、網膜神経節細胞死や視神経乳頭陥凹などが観察されている。しかし残念ながらRCSラットにはチロシンキナーゼ遺伝子に変異があり、視細胞の変性が起こることから、緑内障モデルとしては敬遠されている。

今回は、マウスモデルとその他の動物モデルについて述べる。

文 献

- 1) Ritch R, Shields MB, Krupin T : Animal models of glaucoma. *The Glaucomas* (2nd ed), p55-69, Mosby-Year Book, St Louis, 1996
- 2) Gaasterland D, Kupfer C : Experimental glaucoma in the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13 : 455-457, 1974
- 3) Quigley HA, Hohman RM : Laser energy levels for trabecular meshwork damage in the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 1305-1307, 1983
- 4) Quigley HA, Addicks EM : Chronic experimental glaucoma in primates. I. Production of elevated intraocular pressure by anterior chamber injection of autologous ghost red blood cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 : 126-136, 1980
- 5) Weber AJ, Zelenak D : Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres. *J Neurosci Methods*

- 111 : 39-48, 2001
- 6) Kaufman PL, Lütjen-Drecoll E, Hubbard WC et al : Obstruction of aqueous humor outflow by cross-linked polyacrylamide microgels in bovine, monkey, and human eyes. *Ophthalmology* 101 : 1672-1679, 1994
- 7) Armaly MF : Aqueous outflow facility in monkeys and the effect of topical corticoids. *Invest Ophthalmol* 3 : 534-538, 1964
- 8) Rasmussen CA, Kaufman PL : Primate glaucoma models. *J Glaucoma* 14 : 311-314, 2005
- 9) Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA et al : Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 774-786, 1995
- 10) Miyahara T, Kikuchi T, Akimoto M et al : Gene microarray analysis of experimental glaucomatous retina from cynomolgous monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4347-4356, 2003
- 11) Moore CG, Milne ST, Morrison JC : Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 363-369, 1993
- 12) Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM et al : A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 64 : 85-96, 1997
- 13) Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T et al : Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol* 42 : 337-344, 1998
- 14) Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR et al : Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 402-410, 2002
- 15) Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A et al : Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats [letter]. *Exp Eye Res* 61 : 379-382, 1995
- 16) Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J et al : Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 61 : 33-44, 1995
- 17) Johnson EC, Morrison JC, Farrell S et al : The effect of chronically elevated intraocular pressure on the rat optic nerve head extracellular matrix. *Exp Eye Res* 62 : 663-674, 1996

☆

☆

☆

86. 緑内障の動物モデル (2)

—マウスモデル, その他—

岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター
臨床研究センター(感覚器センター)
分子細胞生物学研究部門

緑内障研究において動物モデルの存在はきわめて重要である。前号では霊長類とラットモデルについて紹介したが、今回はヒトにつく情報量と最新の遺伝子改変技術が利用できるマウスモデルについて、その眼球サイズが小さいことから生まれる実験のむずかしさを含めて紹介したい。

はじめに

霊長類や齧歯類モデルによってこれまでに緑内障の発症機序に関する貴重な情報が得られている。しかし、ヒトとの比較において、厳密には眼球の構造も異なっており、病気の進行速度も加速化されている場合もある。ここで紹介する各モデル動物で観察される現象はそのままヒトに当てはまるわけではない。しかし一つひとつの動物モデルは緑内障の一面を捉えていると考えられ、これらの情報を総合的に検討することによって、緑内障に関係する共通なメカニズムの発見につながる可能性がある。この点について、単一あるいは複数の遺伝子についてこれを欠損や過剰発現させる技術が確立しているマウスモデルには期待が寄せられている。

④マウスモデル

マウスモデルはラットモデルの影で開発が遅れていたが、近年目覚ましいマウスの遺伝子改変技術の進歩によって、目的とするトランスジェニックマウス、ノックアウトマウス、ノックインマウスなどが容易に作製されるようになり、眼球が小型であるという欠点がありながら、モデル動物として利用される機会が増加している。ま

た、マウスは他の哺乳類に比べてデータベースが整備されており、遺伝子、蛋白質、代謝系、行動パターンに至るまで詳細な情報を手に入れることが可能である。

しかしながら、マウスには緑内障モデルとしての欠点も存在する。マウスとヒトでは視神経乳頭周囲の血管構造が異なることや、篩状板が存在しないなどの違いがあり¹⁾、眼球の取り扱いについても不利な面がある。その一つに眼圧測定のむずかしさがある。これまでにマウス専用の侵襲式や非侵襲式の眼圧測定法が開発されているが、最も信頼性の高い眼圧測定法としては、角膜の厚さや曲率半径などに影響されない侵襲式の方法がある。圧力計に接続したガラス管の針をマウスの前房に差し込み、眼圧を測定する方法である。この方法によって、異なるマウスの系について10~20 mmHgの眼圧差が存在することが明らかになった²⁾。非侵襲式の利点は多数のマウスの眼圧を短い時間で測定できることであるが、角膜の性状に影響される。いずれの方法についても安定した結果を得るにはやはり訓練が必要である。

最近の遺伝子解析研究によってミオシリン、チトクロム *P4501B1*、オブチニューリン、*WDR36* が緑内障遺伝子として発見されているが、これらの遺伝子改変マウス

正常マウス

変異体マウス

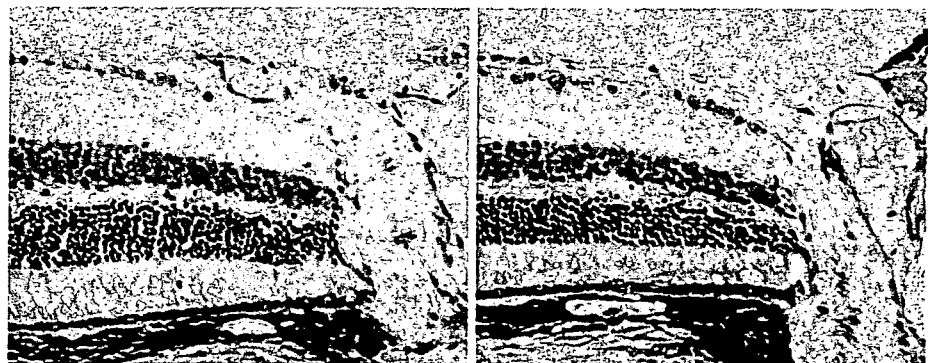


図1 正常マウスとオブチニューリン変異体 (Glu50Lys) を発現するトランスジェニックマウスの視神経乳頭

変異体マウスでは網膜神経線維層が菲薄化している。

が緑内障を発症するのか研究が行われている。遺伝子改変マウスの利点は発症原因が明確なこと、手術的な方法に比べて表現型が安定していること、そして特別な訓練を必要とせずにネズミ算式に繁殖できることである。すでに複数の緑内障マウスが作製されているが、その一つにミオシリンの Tyr437His 変異を発現するトランスジェニックマウスがある。このマウスは正常マウスに比べて昼は 2 mmHg、夜は 4 mmHg の眼圧上昇が認められ、生後 1 年目には網膜神経節細胞数の 20% が減少する³⁾。コラーゲンタイプ I $\alpha 1$ サブユニットに遺伝子変異のあるトランスジェニックマウスではコラーゲンのマトロプロテアーゼ (MMP1) による分解が阻害され、生後 36 週ほどかけて眼圧が 4.8 mmHg 上昇することが報告されている。隅角の構造は保持されたまま、網膜神経節細胞層への障害が観察され、開放隅角緑内障マウスモデルとして認識されている⁴⁾。また、筆者らはオプチニューリン Glu50Lys 変異体を高発現したマウスを作製したところ、正常眼圧は維持されたまま、生後 1 年後には網膜神経節細胞死や視神経乳頭の陥凹が観察されている。

マウスに対する手術的な眼圧上昇はラットよりもさらに困難である。C57BL/6J マウスの前房にインドシアニングリーンを注入し、線維柱帯と上強膜静脈部位の光凝固を施すと、約 10 日後に眼圧が正常なマウスの 15.2 ± 0.6 mmHg に対して 33.6 ± 1.5 mmHg に上昇したが、60 日後には正常値に戻ったと報告されている⁵⁾。網膜神経節細胞層や網膜への機能障害が ERG (網膜電図) などによって明らかにされている。Simon John らによって報告された DBA/2J マウスは 2 つの遺伝子 *Tyrp1* と *Gpnm6*⁶⁾ に変異があり、色素顆粒の分散による虹彩の萎縮が起こり、虹彩癒着によって生後 9 カ月後には眼圧が上昇し、視神経乳頭を基点として網膜神経節細胞死が

扇状に観察されている⁷⁾。

◎その他の動物モデル

その他の動物モデルにはウサギ、ブタ、ウシなどが報告されているが、広く利用されていない。眼における遺伝子の機能をすばやくおざっぱに調べる方法として、ゼブラフィッシュ (zebrafish) を利用した研究が最近報告されており、ミオシリン、オプチニューリン、*WDR36* などの欠損による眼球への影響が報告されている⁸⁾。残念ながら眼圧は測定できない。

文 献

- 1) May CA, Lutjen-Drecoll E: Morphology of the murine optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2206-2212, 2002
- 2) Savinova OV, Sugiyama F, Martin JE et al: Intraocular pressure in genetically distinct mice: an update and strain survey. *BMC Genet* 2: 12, 2001
- 3) Senatorov VV, Malyukova I, Fariss R et al: Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *J Neurosci* 26: 11903-11914, 2006
- 4) Mabuchi F, Lindsey JD, Aihara M et al: Optic nerve damage in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1841-1845, 2004
- 5) Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS et al: Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4337-4346, 2003
- 6) Anderson MG, Smith RS, Hawes NL et al: Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet* 30: 81-85, 2002
- 7) Jakobs TC, Libby RT, Ben Y et al: Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol* 171: 313-325, 2005
- 8) McMahon C, Semina EV, Link BA: Using zebrafish to study the complex genetics of glaucoma. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 138: 343-350, 2004

☆

☆

☆



総説

網膜・硝子体のプロテオーム解析

岩田 岳

〔要 約〕

これまで「遺伝子」「DNA」という言葉をよく見聞きするようになったが、このDNA転写物であるRNAから生成される蛋白質（プロテオーム）の解析が、近年分析技術の向上とともに進歩をみせている。プロテオームはDNAとは異なり、加齢や疾患などの生体の状態によ

て変化するために、疾患の病態を解明するためだけではなく、体内の微量なプロテオームの変化が疾患の検査・早期診断に応用される可能性が期待されている。プロテオーム解析による網膜硝子体研究への応用と課題について紹介したい。

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトが終了し、約2万3千個の遺伝子が発見された。この遺伝子から転写されるRNA（トランスクリプトーム）から10万種類以上のタンパク質が生成されると推察されている（図1）。近年、タンパク質のイオン化技術や質量分析計の精度が向上し、さらにそれを制御・解析ソフトウェアの改良によって、質量分析計の専門技術者でなくても細胞、組織、体液などのタンパク質（プロテオーム）を網羅的に測定し、データを解析することがある程度可能になってきた。健常と病気のプロテオームを比較し、その違いを明らかにすることは、疾患の発症機序を解明するために必要な情報をもたらすだけでなく、疾患バイオマーカーとして早期診断法への応用が期待される。硝子体プロテオームは疾患網膜の状態を反映してダイナミックに変化していると考えられる。網膜疾患によっては脈絡膜毛細血管から網膜成分が漏出し、血漿成分の変化として捉えられる可能

性がある。本編ではここ数年間の質量分析計を用いた網膜・硝子体の網羅的タンパク質解析に焦点を絞り、その利用方法と臨床応用への可能性について紹介したい。

I. 硝子体のプロテオーム

硝子体は眼球内で最も体積を占める透明なゼリー状の組織であり、網膜と接しているために網膜疾患によってその組成は大きく変化していると考え

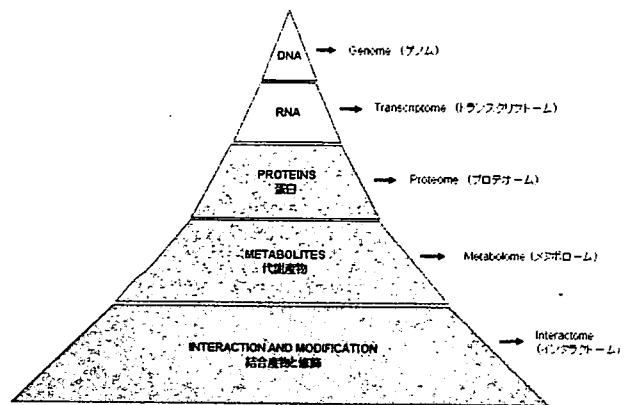


図1 生命現象の研究を総称してフェノミックスという

岩田 岳：独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター（感覚器センター）

られる。硝子体、房水、血漿の蛋白量をそろえて1次元電気泳動を行うと見分けがつかないほど泳動パターンは類似している。これは房水も硝子体も血漿由来の体液であり、血漿を構成する蛋白が硝子体や房水にも多く含まれていることを意味している。これまで我々が扱った房水や硝子体検体の蛋白濃度は出血の有無などによって0.1-1.0 mg/mlであるのに対し、血漿は50-70 mg/mlと50倍以上の蛋白濃度が測定されている。高蛋白濃度の血漿はプロテオミクス（プロテオーム研究）の分野で最も解析が先行しており、1万種類のタンパク質がすでに同定されている。血漿は22種類の蛋白が99%を占めており、微量蛋白は残り1%に含まれている（図2）。質量分析計の性質上、高い濃度で存在する蛋白から検出されるので、血漿を無分画のまま測定するとアルブミン、免疫グロブリン、トランスフェリンなどが検出され、微量タンパク質は検出されにくい。この数年間に22種類の蛋白を除去するための前処理技術として、各タンパク質に特異的な抗体を用いたアフニティークロマトグラフィーカラムなどが開発されているが、我々は東レ株式会社が開発中の中空繊維（ホロファイバー）を用いた低分子分画装置を利用して、低分子量領域に絞って、微量成分の分画を試みている（図3）。硝子体プロテオームは血漿プロテオームで蓄積されたノウハウを応用して微量タンパク質の同定が今後盛んに行われると予想される。

日本は硝子体プロテオームでこれまで世界をリードしており、これまでに報告された4つのパイオニア的な硝子体プロテオーム研究をご紹介したい。2002年、中西等は糖尿病網膜症（3検体）と黄斑円孔（2検体）の患者の硝子体についてそれぞれ2次元電気泳動、質量分析計を用いて分析した結果、50種類の蛋白を同定し、この内の30は血漿には含まれていないことを明らかにした。IgG, α -antitrypsin, α -2-HS glycoprotein, complement C4断片が糖尿病の硝子体で増加していることを報告している¹⁾。2003年小山等は糖尿病網膜症患者の硝子体を1次元電気泳動後、質量分析計で分析した結果、84種類の蛋白の同定に成功し、前年に行った2次元電気泳動と合わせて121種類のタンパク質の同定に成功している。4種類の血管促進因子と3種類の抑制因子、PEDF, endostatin, thrombospondinが検出されている²⁾。また同年、山根等は黄斑円孔（26検体）の硝子体を2次元電気泳動で分画し、400スポットを確認し、78を同定している。同定されたペプチドは18の蛋白に由来しており、この中にはPEDF, prostaglandin-D2 synthase, IRBPが含まれていた。増殖性糖尿病網膜症（33検体）も同様に解析した結果、600スポットを確認し、121を同定した結果、38の蛋白が同定された。EnolaseとCatalaseが糖尿病の硝子体で顕著に増加しており、黄斑円孔の硝子体や糖尿病の血清中には検出されなかった³⁾。2005年には大内等が、

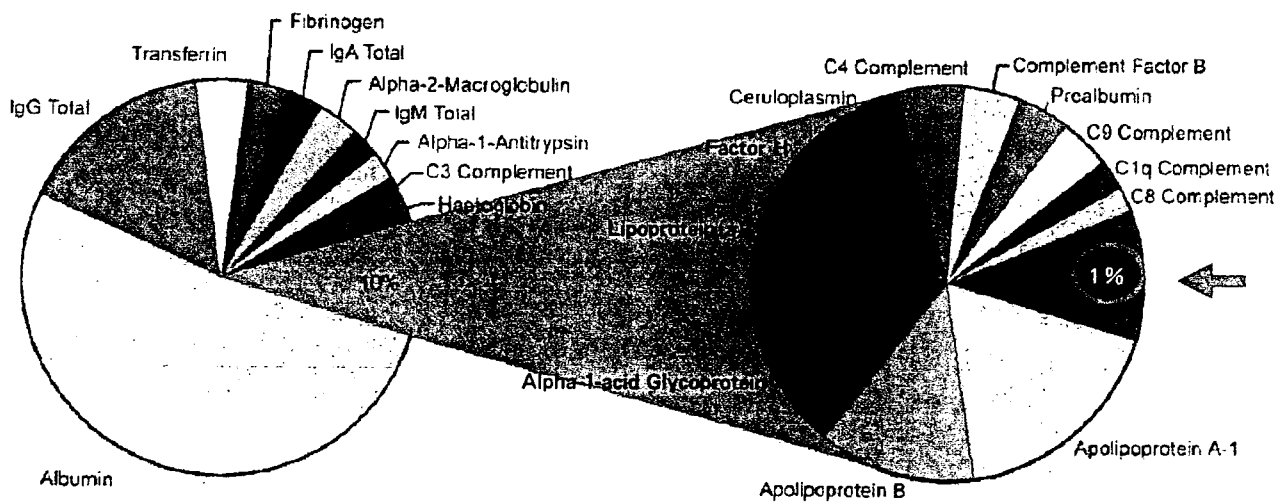


図2 血漿に含まれる蛋白とその割合。22種類のタンパク質が99%を占める

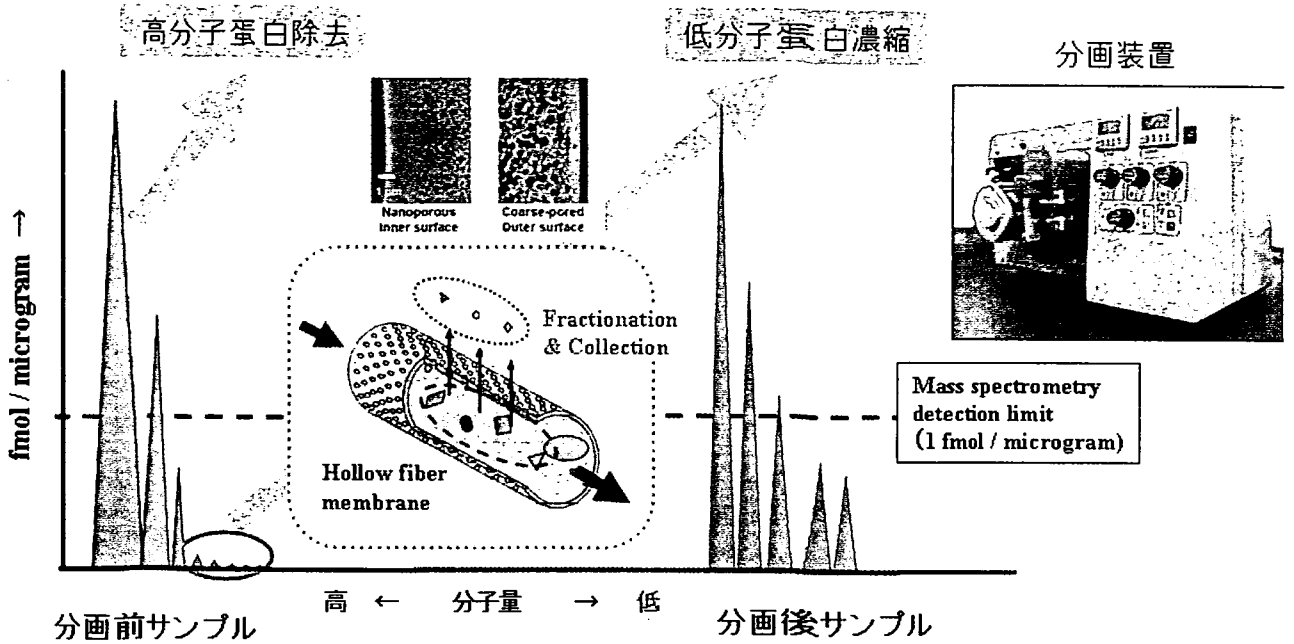


図3 中空紙を使った蛋白分画装置（東レ株式会社製造）による低分子量蛋白の濃縮

増殖性糖尿病初期 (Pre-proliferative) で黄斑浮腫 (DME) の有無 (16:4 検体) の硝子体を2次元電気泳動で分画, 質量分析計した結果, DMEのグループから14種類の蛋白, non-DMEのグループから15種類の蛋白を同定した。特に8スポットは顕著にDMEグループで増加しており, そのうちの6つのスポットはPEDF, ApoA-4, Trip-11, RPBP, VDBPと同定された⁴⁾。

硝子体サンプルは手術中に破棄されるものを倫理委員会の承認と文書による本人の了解を得て集められているが, 検体の多くは病態末期のものが多く, これらの検体を解析しても疾患初期の硝子体の様子を知らることができない。また, 日本では健常者眼球の硝子体を集めることができないために, ベースとなるデータが不足している。

II. 網膜疾患を早期発見するための血漿バイオマーカーの探索

近年, 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(SNP: Single Nucleotide Polymorphism)の生理作用への影響についてはまだ明らかにされていないが, その利用方法については注目されている。ゲノム上の1つのSNPあるいは隣接する

複数のSNPを組み合わせることでブロックにし, これらと疾患の関連を調べる。同染色体に位置するSNPの組み合わせをハプロタイプと呼ぶが, 全てのハプロタイプを明らかにするために国際ハップマッププロジェクト (<http://www.hapmap.org/>) が進行中である。3×10⁹塩基から構成されるゲノム上には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, シリコンベースのDNAチップによって数十万個のSNPを同時に検出することができるようになってきた。この方法によって, すでに加齢黄斑変性の2つのリスク遺伝子 (CFH, Htra1) が同定されており, 発症前にリスクの高い人を選別することが可能になってきた。しかし遺伝子情報だけでは発症の時期まで予測することは困難であり, 発症前の蛋白の量的・質的变化を捉えて発症を予測する方法が検討されている。発症前に健常者の硝子体を検査目的で採取することはきわめて困難であり, これを血漿や尿で代行できるかが課題となっている。網膜・脈絡膜から漏れた蛋白が全身への循環によって希釈されることになり, この微量な変化を検出する精度が求められる。

我々は東京医科大学の西村俊秀客員教授との共

同研究によって血漿蛋白の微量変化を質量分析計によって検出できるか研究している。年齢 65~88 歳の加齢黄斑変性患者 6 名と白内障患者 6 名の血液を採血後 3 分以内に遠心分離によって得た血漿を用いている。血漿からアルブミンと免疫グロブリンを分離して、これを 1 次元電気泳動でさらに分画しても 2 疾患の泳動パターンに差は観察されないが、質量分析のマスキンググラムとマススペクトルを擬似的な 2 次表示にすると微量蛋白の変化が観察されるようになった。我々は同様な研究によって、発症前後の血漿サンプルによって疾患バイオマーカーの存在を検証したいと考えている。

Ⅲ. 質量分析計を用いたドルーゼンのプロテオーム

最近の研究によって加齢黄斑変性に関係が深いとされてきたドルーゼンの構成蛋白が明らかになり、疾患と補体との関係が注目されている。Hageman や Anderson 等は糸球体腎炎の患者で眼底にドルーゼンが観察されることから、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と推測し、免疫染色法によってこれを証明した^{5,6,7)}。さらに、Hollyfield 等もドルーゼンを抽出して、質量分析計によって蛋白組成を解析した結果、補体活性分子の存在を確認した⁸⁾。ドルーゼン内で発見された蛋白にはアミロイド β 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蛋白が確認されている。

ヒトと同様に黄斑が発達している霊長類において、1970 年代から加齢黄斑変性モデルの探索が行われてきた。独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医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社団法人予防衛生協会の鈴木通弘等によって発見され⁹⁾、1 頭の疾患個体から交配実験によって大家系に繁殖することに成功した (図 4)。我々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、ヒトと同様な方法によって疾患個体のドルーゼンを抽出し、プロテオーム解析と免疫染色法によって蛋白組成を解析した。その結果、補体活性分子、抑制分子、クリスタリンなど、ヒトに類似する蛋

白組成が含まれることが明らかになった。疾患サルはヒトが 50 年以上かけて蓄積するドルーゼンと同成分のドルーゼンをわずか 2 年で生成していることになる。疾患は家系内で優性遺伝することから、単一遺伝子の変異によって発症していると考えられ、この原因遺伝子の同定はドルーゼン生成のメカニズムに関わる重要な情報をもたらすと期待している。

Ⅳ. 黄斑のプロテオーム

霊長類と一部の鳥類などで発達している黄斑は視力を決定する重要な部位である。黄斑は錐体細胞が高密度に存在し、周辺網膜に比べて特徴ある構造をしていることから黄斑と周辺網膜との差を分子レベルで解明するために、転写産物 (トランスクリプトーム) の解析が行われ、黄斑特異的な遺伝子発現も報告されている。この研究の延長線上には黄斑のプロテオーム解析が考えられるが、今日まで報告されていない。その理由には 1) 一般的な実験動物であるマウスやラットには黄斑が存在しないこと、2) 黄斑部組織が微量であること、3) 新鮮な黄斑を多数に手に入れることが困難であることなどが考えられる。我々は霊長類医学研究センターにおいて研究目的に安楽死された 13~19 歳の正常なオスザル 8 頭から黄斑部と網膜周辺部を 3 mm 径の円柱でくり抜き、これを 16 眼球について採取し、黄斑と周辺網膜の蛋白抽出液を準備した。これを 2 次元電気泳動によって分画し、黄斑と周辺網膜の泳動パターンから、それぞれに特異的なスポットを複数発見した。これらのスポットをゲルからくり抜き、ペプチドに分解した後に、質量分析計した結果、これまで発見されなかった複数のタンパク質が同定されてきた。黄斑疾患とこれらのタンパク質との関係については研究が続けられている。

Ⅴ. 網膜・硝子体プロテオーム解析の今後の課題

日進月歩の質量分析計の技術革新はこれまで不可能であった蛋白の網羅的解析を可能にし、電気泳動で分画されたスポットを容易に同定できるようになった。眼科分野でもヒトの硝子体、房水、