

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

黄斑変性カニクイザルを用いた補体活性抑制剤による  
加齢黄斑変性の予防・治療法の確立と情報収集システムの開発

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>

黄斑変性カニクイザルを用いた補体活性抑制剤による加齢黄斑変性の

予防・治療法の確立と情報収集システムの開発

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 寺尾 恵治 吉川 泰弘 溝田 淳 西村 俊秀 松野 聖 村上 晶 安川 力	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター 東京大学大学院農学生命科学研究科 順天堂大学医学部浦安病院眼科 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 順天堂大学医学部眼科 名古屋市立大学大学院医科学研究所	教授 センター長 教授 准教授 客員教授 チームリーダー 教授 准教授
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） 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	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

# 目次

## I. 総括研究報告

黄斑変性カニクイザルを用いた補体活性抑制剤による加齢黄斑変性の予防・治療法の確立と情報収集システムの開発

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
三宅 養三	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻
寺尾 恵治	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター
吉川 泰弘	東京大学大学院農学生命科学研究科
溝田 淳	順天堂大学医学部浦安病院眼科
西村 俊秀	東京医科大学臨床プロテオームセンター
松野 聖	参天製薬（株）開発研究センター
村上 晶	順天堂大学医学部眼科
安川 力	名古屋市立大学大学院医科学研究所

## II. 研究成果

# I. 総括研究報告

厚生省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 黄斑変性カニクイザルを用いた補体活性抑制剤による加齢黄斑変性の 予防・治療法の確立と情報収集システムの開発

### 総括研究報告書

主任研究者	岩田 岳	東京医療センター臨床研究センター	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	寺尾 恵治	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター	特別研究員
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	客員教授
分担研究者	松野 聖	参天製薬（株）開発研究センター	チームリーダー
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	安川 力	名古屋市立大学大学院医科学研究所	准教授

研究要旨：加齢黄斑変性の早期発見を目的として、加齢黄斑変性の感受性遺伝子の探索を行い、これを複数発見した（特許出願）。また、加齢黄斑変性の血漿成分を分析し、血中に疾患特有の成分を発見した（特許出願）。さらに、予防・治療を目的として、霊長類医科学研究センターの若年性（遺伝性）の黄斑変性カニクイザルを用いて補体活性化抑制薬による薬効試験を行い、6ヶ月後の眼底観察では効果が現れていることを確認した。今回使用した、補体 C3 因子活性化抑制剤に引き続き、活性経路の直下に位置する補体 C5 因子をターゲットにした補体抑制薬を確保し、徐放剤に加工して8月から実験を開始する。このように、本事業では早期診断法とその予防・治療法の開発が同時に進行しており、これらの情報は総合的なデータベースに統合される予定である。

キーワード： カニクイザル、加齢黄斑変性、遺伝子多型、プロテオーム解析、補体

#### 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歯類には存在しない。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の時間で観察されている。

我々はドルーゼンの組成に補体活性分子

が存在することから補体活性経路が合流するC3及びC5補体因子の抑制によってドルーゼンの蓄積を抑制し、加齢黄斑変性の予防法として利用できるか疾患サルをつかった動物実験を行った。C3及びC5抑制薬をそれぞれ1つ選択し、C3抑制薬は平成19年8月から実験を開始した。また、C5抑制薬に関しては分解しやすい性質のために、徐放剤に加工する作業が行われており、平成20年8月より実験を開始する。

疾患が優性遺伝することから単一の遺伝子変異によって発症すると考えられる。このメカニズムを解明するには原因遺伝子の同定が不可欠であり、マカカ属用の連鎖解析マーカーによって解析を行い、染色体4番長腕の先端に位置することが判明した。この領域には加齢黄斑変性と関係すると思われる遺伝子が3つ存在しており、これらのクローニング及び、塩基配列を解析中である。

疾患サルの研究と平行してヒト加齢黄斑変性がどのような原因で発症するのか、加齢黄斑変性の患者から採血して、DNA150検体（健常者200検体）と血漿50検体（健常者50検体）が収集された。リスク遺伝子の探索にはAffymetrix社のGeneChipの50万遺伝子多型（SNP）チップが用いて、感受性遺伝子を明らかにした（特許出願）。また、疾患によって血漿組成が変化すると予測されたため、東レ株式会社との共同研究によって、低分子血漿蛋白分離装置を開発し、加齢黄斑変性患者の血漿中に含まれる低分子の疾患バイオマーカーを発見した（特許出願）。

本研究は加齢黄斑変性の早期診断と予防法の確立によって発症を抑えることを目的とした総合的な研究事業であり、研究計画に従って、順調に進行している。

## B. 研究方法

### 1) 補体抑制実験に用いる霊長類モデル：

我々はこれまで国立医薬基盤研究所霊長類医学科学研究センターで発見された世界で唯一のドルーゼンを発症する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

的解析を行ってきた。この疾患サルでは50歳以上のヒト加齢黄斑変性の初期に観察される網膜下に蓄積物（ドルーゼン）が生後2年で観察される。我々はドルーゼンの組成に補体活性因子が含まれていることを発見し(Umeda, Iwata et al, IOVS 2005, Umeda, Iwata et al, FASEB J 2005)、また、最近の研究によって補体活性化による網膜下の局所的な炎症反応が加齢黄斑変性の原因として考えられることから、C3及びC5補体抑制剤による予防法の確立を試みた。

三宅先生等によって開発された、局所ERG（網膜電図）測定装置を用いてドルーゼンの蓄積量が多い疾患個体について測定したところ、黄斑部における光に対する反応が著しく低下していることが明らかとなり、萎縮型の加齢黄斑変性動物モデルであることが明らかとなった。

疾患カニクイザルモデルとして、遺伝性の黄斑変性カニクイザル、Lipopolysaccharide (LPS)による網膜下における人工的な補体活性化によるドルーゼンや血管新生の誘発モデルの作製中である。自然発症個体に加え、補体抑制薬によるドルーゼンの抑制及び血管新生の抑制による加齢黄斑変性の予防を試みる。LPSによる補体活性化誘発モデルについてはラットで検討中である。

### 2) 網膜へのドラッグデリバリー：

ドラッグデリバリーには硝子体に埋め込める、生分解性及びプラスチックの素材で作られた小型カプセル（球、筒状）を開発中である。補体抑制薬の性質に適合するかたちで開発が進められており、生体分解性素材では6-12ヶ月、プラスチックでは1-3年の薬効が期待される。補体の古典経路や2次経路を特異的に抑制する2種類の薬剤を検討している。疾患個体8頭に対し、平成19年8月より、毎週C3補体抑制薬の硝子体注入が開始された。徐放剤に加工されたC5補体抑制薬は平成20年8月より実施する。

### 3) 補体抑制薬による動物実験：

補体抑制薬としてC3補体因子の活性を抑制するCompstatin (Lambris et al, J. Immunol. 2000)について1年分を確保し、

50マイクログラムを1週間単位で、1ミリグラムを1ヶ月単位で硝子体内へ注入した。また、名古屋市立大学名誉教授の岡田秀親先生が補体因子C5に対する抑制薬を開発し、蛋白研究所(株)によって徐放剤の開発が行われる。これら2つの強力な補体抑制剤を用いて、霊長類モデルでのドルーゼン生成の抑制または消失が可能か世界的にも注目されている研究が進行中である。この情報は支援情報システムのデータとしても利用される。

(4) 予防・治療法の条件設定を支援するための支援情報システムの構築:

実験期間中に収集するデータはドラッグデリバリー法の生分解性能、補体抑制効果、疾患個体の所見、加齢黄斑変性患者の遺伝子解析結果、加齢黄斑変性患者の血漿解析結果など、形式の異なるデータ(数値データ、テキスト、画像、カテゴリカルデータ、配列情報)をそれぞれ関連付けてデータベース化する必要がある。補体抑制効果が最大限に得られる条件をデータベースから予測できるようにするために、データマイニング機能を開発中である。また、膨大な解析結果を直感的に把握するためのクラスター表示、チャート表示、グラフ表示などの機能を盛り込むためのデータ可視化技術の開発もデータマイニングと平行して開発中である。データマイニングソフトウェアOmniViz(R) Ver3.6.1(インフォコム)等を参考に、これらのソフトウェアを組み合わせ、バイオロジカルデータとケミカルデータ、各種実験解析結果とシミュレーション結果、文献データ、パスウェイ情報、そして特許情報なども含めて統合的に利用できるシステムを構築したい。

(5) 若年性加齢黄斑変性カニクイザルの原因遺伝子の解明:

若年性黄斑変性カニクイザルは常染色体優性遺伝しており、単一遺伝子の変異によってドルーゼンが蓄積し、これを網膜色素上皮細胞が消化できないことが原因と考えられる。この遺伝子の発見はドルーゼンの生成経路の出発点を解明し、新たな加齢黄斑変性の診断や予防・治療法の開発に結びつく可能性がある。サルの染色体4q末端

と疾患との連鎖が観察されているが、この領域はヒト染色体6q末端に相当し、この周辺の遺伝子に網膜、網膜色素上皮細胞あるいは脈絡膜で発現する遺伝子をRT-PCRによってクローニングして遺伝子解析を行う。染色体6q以外についても連鎖解析を継続する(GeneMapper™ ソフトウェア v.3.0、Applied Biosystems Japan)。

(6) 加齢黄斑変性リスク遺伝子の探索:

加齢黄斑変性の患者DNA検体500検体を目標に国立病院機構、順天堂大学医学部浦安病院眼科、杏林大学医学部アイセンターが参加して、150のDNA検体が集められた。このうち100のDNA検体と対象となる健常者の200DNA検体を用いてAffymetrix社のGeneChip 50万SNP(遺伝子多型)を用いてGenome Wide Association Studyが行われた。

(7) 加齢黄斑変性血漿バイオマーカーの探索:

加齢黄斑変性の遺伝子解析と平行して、血漿成分の変化によって疾患の早期発見が可能か、検討を行った。国立病院機構東京医療センターと順天堂大学医学部浦安病院眼科によって加齢黄斑変性患者の血漿50検体を集め、その対象として白内障患者の血漿50検体が集められた。血漿中には22種類の蛋白が99%を占めるために、まずはこれを除くために、東レ株式会社が開発した低分子量蛋白分画装置のプロトタイプを使って分画を行い、その後、逆相クロマトグラフィー、トリプシン処理、2次元クロマトグラフィーを経て、質量分析計によるプロテオーム解析を行った。遺伝子多型解析と血漿疾患バイオマーカーとの相関を解析中である。

## C. 研究結果

1) 補体抑制実験に用いる霊長類モデル:

疾患カニクイザルのドルーゼンについて継続的な観測を行った結果、早い個体では1歳後半から黄斑を中心にドルーゼンが現れ、生後2-5歳の間急激にその数が増

加する。三宅先生等が開発した局所 ERG 測定装置を使って、黄斑を中心として $5^{\circ}$ 、 $10^{\circ}$ 、 $15^{\circ}$ の範囲で光に対する網膜の反応を計測した結果、疾患個体の黄斑部では反応が消失していることが明らかになった。この結果、疾患サルは萎縮型の黄斑変性を発症しており、ヒトの20倍の進行速度でドルーゼンが蓄積し、視機能の障害に至ることが確認された。

## 2) 網膜へのドラッグデリバリー法の開発:

C3及びC5補体活性抑制薬は何れも低分子のペプチドであることから未修飾であれば短い時間で分解される。硝子体への注入間隔は数ヶ月から半年単位が理想的であるが、このためには徐放剤の開発が不可欠である。特にC5補体活性抑制薬は半減期が短いために、今回この抑制薬に適合する生体分解性の素材による徐放剤を新たに選別し、加工作業を行っている。徐放剤に封入されたC5補体活性抑制薬の疾患サルへの硝子体投与は平成20年8月から開始する。C3補体抑制薬は毎週100マイクログラムが硝子体投与されている。

## 3) 補体抑制薬による動物実験:

補体抑制薬として補体因子C3の活性を抑制するCompstatinについて1年分を確保し、50マイクログラムを1週間単位で、1mgを1ヶ月単位で硝子体内へ注入した。その結果、1mg投与の個体については薬の残存量が多く、眼底観察に支障をきたしたので、投与量を $100\mu\text{g}$ に変更し、毎週硝子体投与が行われている。50 $\mu\text{g}$ 硝子体投与の疾患個体4頭について半年が経過したが、疾患個体で投与前に監察されていた輪郭明瞭なドルーゼンが薄くぼやけてきた。今後さらに6ヶ月の観察を行い、その前後の眼底観察によって最終的な薬効を判断する。同じ抑制薬はアメリカで第1相試験が開始されており、我々の実験は世界的に注目されている。

## (4) 予防・治療法の条件設定を支援するための支援情報システムの構築:

平成13-15年に行われた感覚器障害研究事業で構築された加齢黄斑変性症例登録システムをベースにして、実験期間中に

得られるデータを総合的に収集するシステム開発が行われている。患者症例情報に加え、患者遺伝子情報、患者血漿蛋白情報、ドラッグデリバリーの生分解性能、補体抑制能などが総合的にデータベース化され、情報の検索だけでなく、入力情報の内容によって適切な支援情報が出力されるように開発中である。

## (5) 若年性加齢黄斑変性カニクイザルの原因遺伝子の解明:

2006年に発表されたマカカ属の連鎖解析マーカーを用いて生存する個体から抽出されたDNA検体についてフラグメント解析に続き、連鎖解析が行われた。また、2007年にはマカカ属のアカゲザルのゲノム配列が論文として報告され、その後徐々にアノテーションが終了した遺伝子配列、遺伝子多型、新たな連鎖解析マーカーがデータベース上に投稿されている。我々はこれらの情報を基に染色体4q領域(ヒト6q)をさらに詳しく解析した結果、ヒトの6q27領域に相当するサル連鎖解析マーカーと強く相関することが明らかになった。この領域には網膜、網膜色素上皮細胞で発現する遺伝子が3つ以上存在し、これらを現在解析中である。

## (6) 疾患個体から分離培養された網膜色素上皮細胞のマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析及びプロテオーム解析による蛋白発現解析:

網膜色素上皮細胞は神経網膜と脈絡膜層を分離する重要なバリアーの役目を果たしており、視細胞外節のどん食作用や各種成長因子の放出など、網膜の恒常性維持には不可欠である。この細胞の機能低下によってドルーゼンの蓄積が起こると予測されている。今回我々は疾患2個体及び正常2個体から網膜色素上皮細胞の分離培養に成功し、カニクイザル専用のマイクロアレイによる遺伝子発現解析及び二次元電気泳動と質量分析計によるプロテオーム解析を行い、このデータを解析中である。

## (7) 加齢黄斑変性リスク遺伝子の探索:

加齢黄斑変性の患者DNA検体500検体を目標に国立病院機構、順天堂大学医学部



浦安病院眼科、杏林大学医学部アイセンターが参加して、150のDNA検体が集められた。このうち100のDNA検体と対象となる健常者の200DNA検体を用いてAffymetrix社の50万SNP（遺伝子多型）チップを用いて解析した。結果、患者特有の遺伝子多型（SNP）を選別することに成功した。これらのSNPをグループ化し、ハプロタイプとして計算した結果、リスク遺伝子を選別することに成功した。

また、エール大学のJ Hoh等との共同研究によってセリンプロテアーゼ11プロモーター領域の遺伝子多型（SNP）と日本人の滲出型加齢黄斑変性と強く相関することを明らかになった。我々が独自に行ったGenome Wide Association Study (GWAS)によってもこの相関は確認された。さらに今回のGWASでは新たに疾患と相関する領域を複数発見し、現在この領域の解析を行っている。これらの情報は加齢黄斑変性患者に共通の遺伝的体質を明らかにするものであり、早期診断法の確立だけでなく、発症機序の解明にもきわめて重要な発見が行われたことになる。GWAS結果は特許として出願中である。

#### （8）加齢黄斑変性血漿バイオマーカーの探索：

血漿成分によって疾患の早期発見が可能か検討した。東レ株式会社と共同開発した低分子量蛋白分画装置を用いてアルブミンやグロブリンなどの主蛋白が除かれ、その残りの分画について逆相クロマトグラフィーを行った結果、加齢黄斑変性患者と白内障患者のクロマトグラムには大きな差が観察された。これからフラクション別にトリプシン処理を行い、2次元クロマトグラフィーでさらに分画した後に質量分析計によってプロテオーム解析が行われた。この結果、加齢黄斑変性の患者のみで検出されるタンパク質を複数発見した（特許出願）。現在これらのタンパク質について抗体を用いて、患者・健常者の血漿中での濃度及び霊長類の眼球切片による免疫染色法による解析を行っている。

#### D. 考察

本研究では血管新生をとまなう最も重篤な滲出型加齢黄斑変性の患者さんから血液検体を収集し、遺伝子多型解析及びプロテオーム解析を行った。その結果、加齢黄斑変性の感受性遺伝子の発見及び疾患バイオマーカーとしての血漿蛋白の探索に成功した。その一方で萎縮型加齢黄斑変性霊長類モデルを利用した補体活性抑制薬の薬効試験を実施した。

今回使用したAffymetrix社のGeneChip 500Kは糖尿病、ガン、リュウマチなどの分野で大きな成果を上げており、我々の研究結果もこれまでの研究結果を支持しつつ、新たに複数の感受性遺伝子を釣り上げるようになった。これまで主に米国主導で行われてきたマイクロサテライトマーカーによる連鎖解析と異なって、大幅な解像度の向上によってピンポイントに遺伝子を特定することが可能になった。

最も上位を占めるSNPはp値が $1 \times 10^{-10}$ を下回っており、データの信頼度がきわめて高い。加齢黄斑変性が多遺伝子疾患であると考えられることから、上位を占める遺伝子領域は相互に疾患の発症に関係していると予想される。来年度はこの関係を明らかにし、軽症で終息する患者と重症に進行する患者の区別が遺伝子レベルで可能か検討を行う。

眼科疾患の進行を判断するために眼球内部の体液を検査対象にすることは困難である。加齢黄斑変性は血液や免疫系と深く関係することから、患者の血液中の微量成分が変化すると予測してプロテオーム解析を行った結果、複数のタンパク質が患者で変化していることが明らかになった。疾患バイオマーカーとしてだけでなく、加齢黄斑変性の病理学的観点からも興味深い。

これらの遺伝子について今後総合的なアプローチによる機能解析を行う計画であり、疾患サルの候補遺伝子としても検討していく。

疾患カニクイザルの原因遺伝子の同定はカニクイザル・ゲノムの情報不足によって遅い進行であったが、2007年にカニクイザルと同じマカカ属のアカゲザル (Rhesus Monkey) のゲノム解読がScience誌

に発表され、連鎖解析マーカーも一挙にデータベース上に公開され、疾患原因遺伝子座が染色体4q先端に絞り込まれた。このScience誌では我々の仕事が紹介された。この領域には3つの候補となる遺伝子が存在し、ゲノム情報に基づいてクローニングを行っている。

ドルーゼンに補体活性化分子が発見され、欧米人の加齢黄斑変性の感受性遺伝子として補体H因子の関与が報告されてから、疾患と補体との関係が注目されるようになった。補体の活性化は周辺網膜を障害することから、これを抑制することによって疾患の予防・治療の可能性を検討した。補体活性化経路は古典経路、2次経路、そしてレクチン経路が存在するが、何れも補体C3因子で合流し、その直下にC5因子が存在する。C3及びC5因子に対する有効な抑制薬で毒性がきわめて少ないことが確認されている薬を用いて今回の実験が行われた。C3抑制薬であるコンプスタチンは2種類の濃度で硝子体投与が行われたが、50 $\mu$ gの低濃度でもその効果が現れている。平成20年度7月まで薬効試験を続行し、C3抑制による予防・治療法の有効性を判断する。また、徐放剤に加工中のC5抑制薬は8月より硝子体投与を行う予定である。

疾患2個体及び同年齢の正常2個体から培養された網膜色素上皮細胞はその性質が大きく異なることが明らかにされた。網膜色素上皮細胞への障害とドルーゼンが若年で蓄積することは直接的あるいは間接的に関係していると予想される。加齢黄斑変性の根幹につながる情報が得られる可能性があり、平成20年度は疾患個体から得られた網膜色素上皮細胞を詳細に解析する。

## E. 結論

遺伝性の黄斑変性カニクイザルを使って補体抑制による加齢黄斑変性の予防を試みる。C3補体因子、C5補体因子をターゲットにした補体抑制薬を確保し、来月から霊長類医学科学研究センターで実験が開始される。また、原因遺伝子の探索、ヒト加齢黄斑変性のリスク遺伝子の解明が行われた。リス

ク遺伝子の解明は加齢黄斑変性の始点を明らかにしたことになる、今後の機能解析が期待される。遺伝子解析と平行して血漿プロテオーム解析によって血漿蛋白の微量な変化を検出し、早期診断に応用できるか検討中である。これらの情報は総合的なデータベースと検索システムに統合され、加齢黄斑変性の早期発見、予防法の選択に利用できるようにしたい。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yoshida T, Wan AD, 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.

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.

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.

Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tanuma R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. BMC Genomics. 2008 Feb 24;9(1):90

Nakamura S, Okabayashi S, Ageyama N, Koie H, Sankai T, Ono F, Fujimoto K, Terao K. Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey. Vet Pathol. 2008 Jan;45(1):67-72.

Kimura N, Imamura O, Ono F, Terao K. Aging attenuates dynactin-dynein interaction: down-regulation of dynein causes accumulation of endogenous tau and amyloid precursor protein in human neuroblastoma cells. J Neurosci Res. 2007 Oct;85(13):2909-16.

Kikuchi T, Hara M, Terao K. Development of a microsatellite marker set applicable to genome-wide screening of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Primates. 2007 Apr;48(2):140-6.

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. 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)

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

### 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、フォジヨセフィーン、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 6<sup>th</sup> 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

(加齢黄斑変性患者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



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

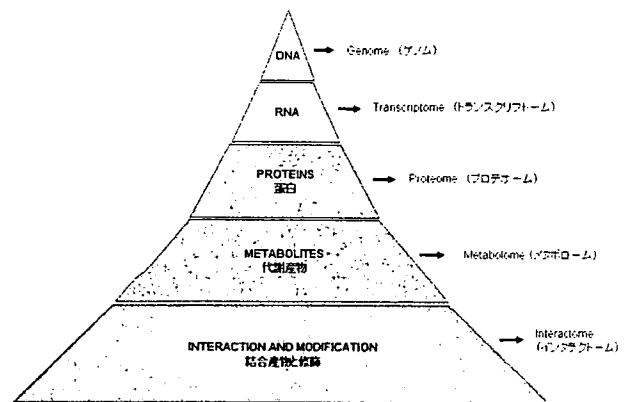


図1 生命現象の研究を総称してフェノミックスという

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ィ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,  $\alpha$ -antitrypsin,  $\alpha$ -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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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、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<sup>3)</sup>。2005年には大内等が、

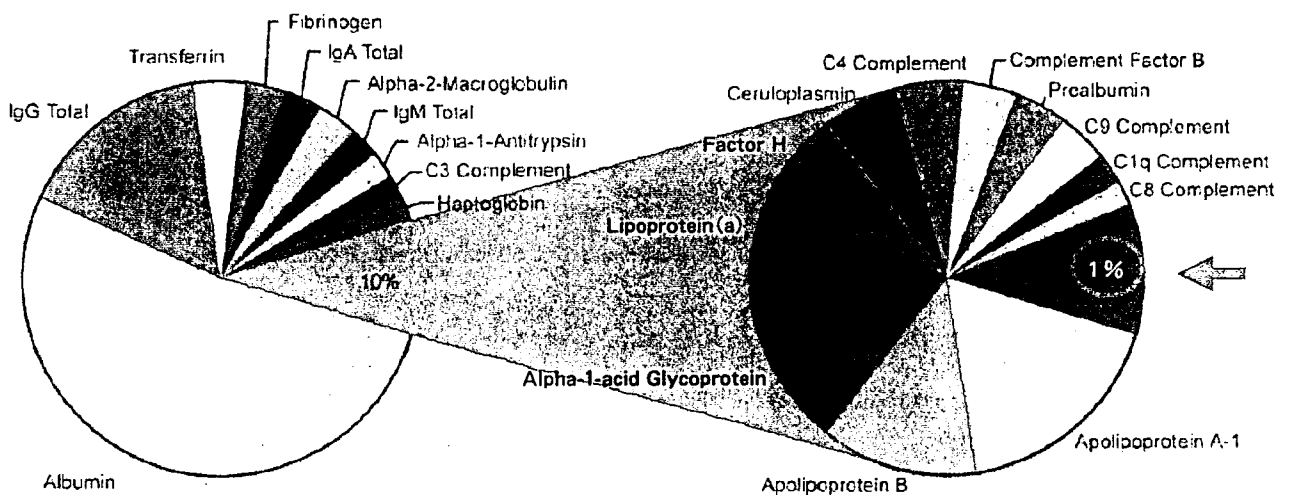


図2 血漿に含まれる蛋白とその割合。22種類のタンパク質が99%を占める

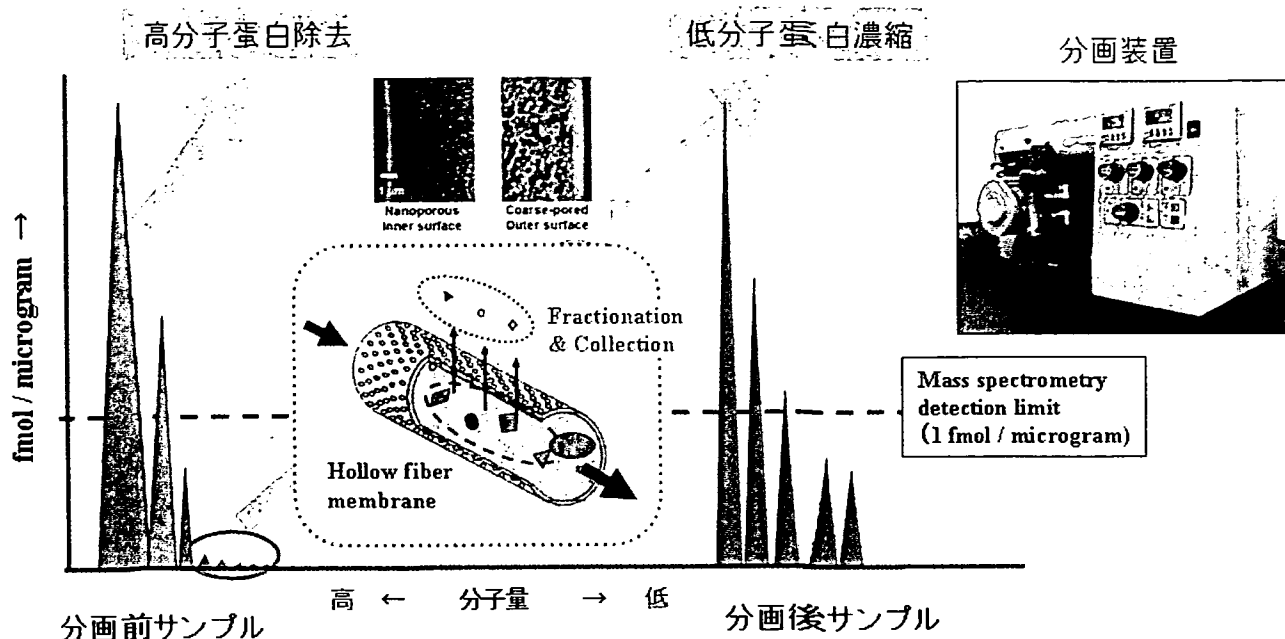


図3 中空紙を使った蛋白分画装置（東レ株式会社製造）による低分子量蛋白の濃縮

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<sup>4)</sup>。

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。3×10<sup>9</sup>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*, *Htra 1*) 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<sup>5,6,7)</sup>。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<sup>8)</sup>。ドルーゼン内で発見された蛋白にはアミロイド $\beta$ 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社団法人予防衛生協会の鈴木通弘等によって発見され<sup>9)</sup>、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。我々は霊長類医科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、

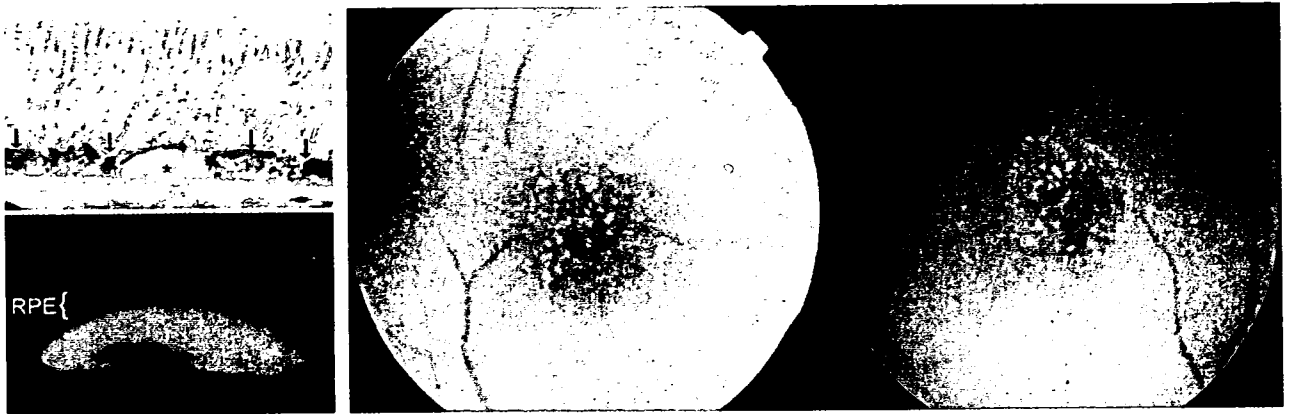


図4 独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医学研究センターで発見された若年性黄斑変性カニクイザルの眼底写真(右)とドルーゼン(左上)およびドルーゼン中の補体活性化(左下)

涙液の網羅的プロテオーム解析, トランスジェニックやノックアウトマウスの眼組織のプロテオーム解析などが行われている。また, 最新機器と解析ソフトを利用するとリン酸化, 糖, 脂質の修飾を受けた蛋白の同定や修飾されたアミノ酸の特定も可能になった。我々は黄斑に特異的な蛋白を探索する過程で, リン酸化蛋白の量的変化を観察している。蛋白修飾の生理的な意味や疾患との関係は今後明らかにされていくと期待される。このような網羅的修飾蛋白の解析はプロテオミクスによって初めて可能になった技術である。

質量分析計にも克服されなければならない弱点が存在する。その一つに質量分析計には定量性が欠けることである。サンプル間に含まれる特定の蛋白について量的変化を高い精度で測定することができない。これまでは電気泳動後のバンドやスポットの濃さとして測定されたり, 比較するサンプルを異なる同位体元素でそれぞれラベルして, 質量分析計によってラベル化されたペプチドの検出回数として測定されたりする方法が行われてきた。同定した蛋白の定量性について今後の技術開発が望まれている。

### おわりに

これまで利用されてきたDNAチップを使った網羅的なトランスクリプトーム解析に加え, これにプロテオーム解析を組み合わせることによって, 解析する領域を遺伝子発現から蛋白発現までに広げることが可能になった。DNAチップによって23,000遺伝子の変化を観察し, 同時に蛋白の有無

を観察することができる。我々も同様な方法によって網膜色素上皮細胞を特異的に増殖させる因子(REF-1/TFPI-2)の作用機序を研究している<sup>10)</sup>。この研究では発現量が変化する蛋白間の関係を裏付けるデータとして, 遺伝子発現データを利用した。今後はここへ蛋白修飾のデータも加わり, フェノミックスの世界へ一歩近づき, 疾患の理解, 診断法の開発, さらには治療へと発展するものと期待される。

### 【文 献】

- 1) Nakanishi T, et al: Catalogue of soluble proteins in the human vitreous humor: comparison between diabetic retinopathy and macular hole. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 776 : 89-100, 2002.
- 2) Koyama R, et al: Catalogue of soluble proteins in human vitreous humor by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry including seven angiogenesis-regulating factors. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 792 : 5-21, 2003.
- 3) Yamane K, et al: Proteome analysis of human vitreous proteins. *Mol Cell Proteomics* 2 : 1177-1187, 2003.
- 4) Ouchi M, et al: Proteomic analysis of vitreous from diabetic macular edema. *Exp Eye Res* 81 : 176-182, 2005.
- 5) Hageman GS, 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, 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) Crabb JW, et al: Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 14682-14687, 2002.
  - 8) Umeda S, 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.
  - 9) 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.
  - 10) Shibuya M, et al: Proteomic & Transcriptomic Analyses of Retinal Pigment Epithelial Cells Exposed to REF-1/TFPI-2, a Growth Promoting Factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 516-521, 2007.
-



# *HTRA1* promoter polymorphism predisposes Japanese to age-related macular degeneration

Tsunebiko Yoshida,<sup>1</sup> Andrew DeWan,<sup>2</sup> Hong Zhang,<sup>2</sup> Ryosuke Sakamoto,<sup>1</sup> Haru Okamoto,<sup>1</sup> Masayoshi Minami,<sup>1</sup> Minoru Obazawa,<sup>1</sup> Atsushi Mizota,<sup>3</sup> Minoru Tanaka,<sup>3</sup> Yoshihiro Saito,<sup>4</sup> Ikue Takagi,<sup>5</sup> Josephine Hoh,<sup>2</sup> Takeshi Iwata<sup>1</sup>

(The first four authors contributed equally to this publication)

<sup>1</sup>National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Department of Epidemiology and Public Health, Yale University School of Medicine, 60 College Street, New Haven CT 06520, <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Juntendo University Urayasu Hospital, Chiba, <sup>4</sup>Division of Ophthalmology, National Hospital Organization Osaka Medical Center, Osaka, <sup>5</sup>Division of Ophthalmology, National Hospital Organization Kyushu Medical Center, Fukuoka, Japan

**Purpose:** To study the effect of candidate single nucleotide polymorphisms (SNPs) on chromosome 10q26, recently shown to be associated with wet age-related macular degeneration (AMD) in Chinese and Caucasian cohorts, in a Japanese cohort.

**Methods:** Using genomic DNA isolated from peripheral blood of wet AMD cases and age-matched controls, we genotyped two SNPs, rs10490924, and rs11200638, on chromosome 10q26, 6.6 kb and 512 bp upstream of the *HTRA1* gene, respectively, using temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE) and direct sequencing. Association tests were performed for individual SNPs and jointly with SNP complement factor H (CFH) Y402H.

**Results:** The two SNPs, rs10490924 and rs11200638, are in complete linkage disequilibrium ( $D'=1$ ). Previous sequence comparisons among seventeen species revealed that the genomic region containing rs11200638 was highly conserved while the region surrounding rs10490924 was not. The allelic association test for rs11200638 yielded a p-value  $<10^{-11}$ . SNP rs11200638 conferred disease risk in an autosomal recessive fashion: Odds ratio was 10.1 (95% CI 4.36, 23.06), adjusted for SNP CFH 402, for those carrying two copies of the risk allele, whereas indistinguishable from unity if carrying only one risk allele.

**Conclusions:** The *HTRA1* promoter polymorphism, rs11200638, is a strong candidate with a functional consequence that predisposes Japanese to develop neovascular AMD.

Japanese patients are predominantly affected with vascular or “wet” AMD with little or no drusen deposition, in contrast to the Caucasian population which has a higher prevalence of drusen formation and the dry form of the disease. Association between the complement factor H (CFH) Y402H polymorphism (CFH 402) and age-related macular degeneration (AMD) has been shown in twelve or so different Caucasian populations [1,2]. However, that association failed to be replicated in Japanese populations, in which no control individual was found to be homozygous for the risk allele [3,4].

*HTRA1* is a member of the heat shock serine proteases and is up-regulated by cellular stress. *HTRA1* is expressed in both the human and mouse retina [5,6]. Recently a promoter single nucleotide polymorphism (SNP) rs11200638 in *HTRA1* was shown to be highly associated with wet AMD [6,7]. Furthermore, *HTRA1* resides in a region of chromosome 10q26 that has been implicated as the “top” candidate region for AMD. Here we test two SNPs, rs10490924 (6.6 kb upstream

of *HTRA1*), and rs11200638, for their association to wet AMD in a Japanese population.

## METHODS

We genotyped 88 neovascular AMD cases and 97 AMD-free age-matched controls for SNPs rs10490924 and rs11200638. Case and control individuals were the same as our previous CFH association study [3] with all cases being characterized as AMD grade 5B [1]. Among cases the mean age was 74.8 years (standard deviation: s.d. 8.8 years) and 70.5% male; among controls the mean age was 71.1 years (s.d. 9.1 years), and 38.1% male. Informed consent was obtained from all participants, and the procedures used conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki. Genotyping was performed as described previously [3]. Briefly, PCR was performed using primers designed to amplify the genomic region containing each SNP (rs10490924 forward: 5'-GGT GGT TCC TGT GTC CTT CA-3', reverse: 5'-GGG GTA AGG CCT GAT CAT CT-3'; rs11200638 forward: 5'-CGG ATG CAC CAA AGA TTC TCC-3', reverse: 5'-TTC GCG TCC TTC AAA CTA ATG G-3'). Following amplification, genotype determination was performed on the PCR products using either temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE; Reveal SpectruMedix,

Correspondence to: Josephine Hoh, Department of Epidemiology and Public Health, Yale University, 60 College Street, Room 416, New Haven CT 06520, Phone: (203) 785-6831; FAX: (203) 785-6279; email: josephine.hoh@yale.edu