

200828002A

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20年度 総括研究報告書

平成21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>

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20年度 総括研究報告書

平成21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>

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21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 溝田 淳 村上 晶 谷戸 正明 石田 成弘	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻 順天堂大学医学部浦安病院眼科 順天堂大学医学部眼科 島根大学医学部眼科 参天製薬（株）開発研究センター	教授 准教授 教授 講師 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 E-Mail:wakuishoko@kankakuki.go.jp	秘書
経理事務担当	高橋 周子	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 事務部 企画課 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL: 03-3411-0111 FAX: 03-3411-0366 E-Mail: ShTakahashi@ntmc.hosp.go.jp	事務員

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

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

谷戸 正樹

島根大学医学部眼科・講師

石田 成弘

参天製薬（株）開発研究センター・主任研究員

II. 研究成果の刊行物・別刷

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	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	谷戸 正樹	島根大学医学部眼科	講師
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Vav2/Vav3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。緑内障患者を対象とした全ゲノム相関解析(Genome Wide Association Study)によって原発開放隅角緑内障の感受性遺伝子多型を発見し、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。

1. 研究目的

緑内障は遺伝子、習慣、環境、習慣などの複数の危険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・プロジェクトなどから人種間の遺伝的背景は異なっており、欧米人でヘテロな遺伝子多型(SNP)が日本人ではホモであることは常に経験することである。したがって、日本人の緑内障のリスク遺伝子を解明するには日本人の患者の遺伝子多型解析が必要である。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400検体収集し、その中から100検体を抽出して、Affymetrix GeneChip 500Kを用いたゲノムワイド相関解析(Genome Wide Association Study, GWAS)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、200名の対照群と比較した。

また、遺伝子配列の変化に加えてタンパク質レベルでの変化を患者と健常者について比較するために血漿成分について網羅的プロテオーム解析を行った。遺伝因子から予測困難な発症のタイミングを予測することを目的とする。

さらに、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マウスの失敗を知り、OPTNとWDR36に研究を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網膜周辺での神経線維の萎縮から始まり、神経節細胞死、アマクリン細胞死などが観察された。これら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、予防・治療薬の開発にも役立つ。最新

の研究から補体 C1q の神経細胞シナプスでの異常発現によってマイクログリアによる神経伝達切断が生じていることが明らかになり、緑内障でも同様にこの現象が観察されている。我々は補体活性経路（古典、2次、レクチン経路）が合流する補体因子 C3 の阻害薬（コンスタンチン）を用いた神経保護お薬効試験をマウスで試みた。

本研究事業で得られた多くのデータについて知的所有権の出願を行った。

2. 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 800 検体収集した。この多施設共同研究には国立病院機構、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、その他関東付近の眼科病院が複数参加した。収集 DNA 検体内、300 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（200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）を明らかにした。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タンパク質の微量な質的・量的変化が生じると予測されている。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、血漿タンパク質の組成（血漿プロテオーム）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。血漿中の 99% は分子量 5 万ダルトンを越える 22 種類の蛋白で占められており、これらのタンパク質を東レ（株）と共同開発した血漿低分子蛋白分画装置を使って除去し、逆相クロマトグラフィー、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 次元

的に分画され、LC-MS/MS イオントラップ型質量分析計（Thermo Fischer Scientific）を使って緑内障に特異的に存在する血漿タンパク質を同定した。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) 開放隅角緑内障マウスの作製:

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。本研究では OPTN 遺伝子の E50K, Del 1st LZ, H486R, Del 2nd LZ, Wild-type と WDR36 D658G, Del657-659, DelWD8, Wild-type が作製された。また、Vav2/3 遺伝子のノックアウトが作製され、牛眼を発症するマウスが誕生した。疾患マウスについては眼底観察に加え、眼圧測定、ERG、網膜切片、網膜フラットマウントによる免疫染色が行われた。

(4) 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、COS1 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。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析については研究計画書、患者説明書、患者同意書、患者撤回書を作成し、東

京医療センター及び関係施設の倫理委員会
で審査され、承認された施設からのみ DNA 検
体を収集した。患者が検体の破棄を希望した
場合には直ちに検体を焼却処分する。動物実
験においては、いずれの実験も動物への苦痛
を軽減する処置を取ること、使用動物数を最
小限にすること、苦痛を与えないよう十分な
麻酔をかけること、手術処置は両眼でなく片
眼のみに行う等、*in vitro* 試験等の代替法
を導入するなど動物愛護上の注意を心がけ、
所属施設の「動物実験倫理委員会」の承認を
得た。

3. 研究結果及び考察

(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
の一方は多数のアミノ酸置換をともなう 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。現在、アメリカ、インド、
オーストラリアで同じ GeneChip を使って研
究が行われており、今後の比較研究が注目さ
れる。本研究結果は知的財産権の価値があり、
特許出願した (特願 2008-267716 緑内障の
リスクの予測方法)。

(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 50 kDa 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。同定されたタンパク質にはドレブリンな
どサルの網膜切片で網膜神経線維に高発現
するタンパク質も発見されており、緑内障で
破壊された細胞から分解産物として血漿中
に漏れてきたと考えており、緑内障の進行を
血漿タンパク質の量的変化で測定できると
期待される。本研究結果は知的財産権の価値
があり、特許出願した (特願 2008-091522 神
経障害の検定のための組成物、キットおよび
方法)。

(3) 開放隅角緑内障マウスの作製:

OPTN と WDR36 の変異体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
死が観察された。OPTN と WDR36 のト
ランスジェニックマウスは網膜周辺から神
経節細胞やアマクリン細胞の変性が観察さ
れ、OPTN では生後 12 ヶ月、WDR36
では生後 6 ヶ月で病態として確認できた。変
異体が眼球の全細胞で発現しているにもか
かわらず、緑内障に関係する網膜神経節細胞
やグリア細胞のみに影響が観察されるのは
驚きである。結果的には WDR36 (Del
657-659) が最も重篤なマウスとして生まれ、
きわめて再現性が良い。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。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 14 mmHg 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。OPTN マウス
については網膜周辺部の神経節細胞と接続
するアマクリン及びグリア細胞であるアス
トロサイトの変性も観察された。ところが W
DR36 も同様な神経細胞の変性が観察され
るが、アストロサイトの変性は観察されな
かった。このように OPTN と WDR36 は

同様な病態に発展するが、そこに関与する細胞のメカニズムは異なっており、このような差が患者の治療に影響することは予測される。本研究結果は知的財産権の価値があり、特許出願した（特願 2008-241209 トランスジェニック動物）。

(4) 牛眼マウスの作製：

Vav2/3 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、また、我々は毛様体での発現も確認し、房水産生にも係っていることを明らかにした。

(5) 緑内障遺伝子の機能解析：

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、免疫沈降法、蛍光タンパク相互作用などをつかって OPTN-Rab8 の蛋白相互作用を分析してきた。E50K 変体は Rab8 との相互作用が阻害され、細胞内での小胞輸送が障害されることによってゴルジ体から細胞膜への輸送系が遮断されている可能性がある。全ての分泌タンパク質が阻害されているのか、選択的に阻害されているのか現時点では明らかでないが、分泌されていないものが明らかになれば、それを補うことによって少なくとも OPTN による緑内障を治療することは期待できる。

また、WDR36 はリボソームの代謝に関係していることが明らかになってきたが、このリボソームは神経細胞突起で盛んに発現され、アクソンの伸長に関係していることが明らかになってきた。WDR36 はリボソーム代謝が阻害される最初の神経症として報告できる可能性があり、WDR36 (Del1657-659) マウスの神経突起の様子を解析中である。

4. 評価 (研究成果)

1) 達成度について

今回我々は全ゲノム相関解析によって原発

性解放隅角緑内障と相関する遺伝子多型を複数発見し、緑内障患者の血漿中により多く含まれるタンパク質の同定にも成功している。また、OPTN、WDR36 の遺伝子改変によってヒトの遺伝子変異を反映する世界で初めての緑内障マウスの作製に成功した。またその過程で神経細胞死に補体 C1q の関与が観察され、その抑制によって緑内障予防の可能性を見出した。しかし霊長類への応用までは今回発展させることができなかった。本研究計画のほぼ85%が達成できたと考えている。

2) 研究成果の学術的異議について

緑内障のリスク因子には遺伝、習慣、環境があると考えられているが、緑内障と相関する遺伝多型と血漿タンパク質の発見は早期診断だけでなく、発症機序の解明にも重要な情報である。また、今回は OPTN、WDR36、Vav2・3 遺伝子改変によって3種類の緑内障マウスモデルが作製されたことは世界でも初めてのことであり、学会で複数発表したところ、国内外からマウスの使用についての依頼が多数寄せられている。これらのマウスは緑内障を根本的に理解するための材料として利用されていくと期待される。

3) 研究成果の行政的意義について

バイオマーカーの発見やマウスモデルの作製について知的財産権の価値が見出され、複数の特許出願が実現した。今後得られた遺伝子、タンパク質の情報と疾患個体を用いて国内外の研究者及び企業と多くの応用研究が開けると期待される。

4) その他特記すべき事項について

今回の作製された緑内障マウスは国内外の眼科学会で高い評価を受けたが、マウスの神経乳頭や乳頭付近の血管構造はヒトと異なっており、その病理学的解釈が難しい場合がある。やはりヒトに最も類似する霊長類モデルの作製が望まれ、残念ながら本研究ではそこまで発展させることはできなかったが、OPTN と WDR36 の緑内障マウスは変異体遺伝子を非特異的に高発現することによって実現しており、同様な原理に基づいて霊長類の硝子体にウイルスベクターを用いて変異体遺伝子を高発現すれば、マウスと同様な結果が

得られると予測される。現在利用されている
霊長類モデルはレーザーによる隅角の焼灼に
よって一過性の高眼圧を誘導して作製される
が、変異体の遺伝子導入によって進行型の緑
内障霊長類モデルの可能性が開け、ヒト用眼
科診断機器を使ったより精度の高い研究が可
能になると思われる。

5. 結論

我々は本研究において緑内障に相関する遺
伝子多型、緑内障の患者血漿に存在する血漿
タンパク質、さらに3つの緑内障マウスモデ
ルの開発を行った。収集された多くのデータ
は今後の診断キットや予防・治療薬の開発や
次の緑内障霊長類モデルの基礎になると考
えている。今回のマウスモデルの研究から明ら
かにされたことはOPTNとWDR36の変
異体が神経節細胞やアマクリン細胞への影響
は異なるにも関わらず、最終的な病態にはあ
まり変化がないことである。緑内障は少なく
とも30種類の遺伝子がグループ別に関与し
ていると考えられ、網膜色素変性と同様なこ
とが予測されている。病気の詳細なグループ
分けと同時に分子レベルでの共通点の探索が
必要と思われる。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表

7件

原著論文による発表 0件

それ以外(レビュー等)の発表 1件

そのうち主なもの

論文発表

岩田岳 図説 感覚器疾患シリーズ No9 特
集; 視覚障害(3) 眼疾患バイオマーカー
の探索

国立医療学会誌 医療 Vol.62 No9
SEPTEMBER 2008

学会発表

第112回日本眼科学会総会(横浜、2008、4)
木村至、岡本はる、池在龍、皆見政好、岩田
岳。毛様体のプロテオーム解析

第112回日本眼科学会総会(横浜、2008、4)

関麻子、吉田統彦、梅田慎介、鈴木通弘、吉
田康弘、岩田岳。遺伝性黄斑変性症カニクイ
ザルの連鎖解析による原因遺伝子の探索

第112回日本眼科学会総会(横浜、2008、4)
池在龍、岡本はる、鈴木通弘、吉川泰弘、岩
田岳。

黄斑変性カニクイザルの網膜色素上皮細胞
の解析

第28回日本眼薬理学会(岡山、2008、9) 岩
田岳 緑内障遺伝子改変動物の基礎

第45回補体シンポジウム(北海道、2008、7)
岩田岳、池在龍、関麻子、吉田統彦、三宅養
三、溝田敦、鈴木通弘、寺尾恵治、吉川泰弘。
黄斑変性カニクイザルにおける補体関連分
子の解析

第1回 Retina Research Meeting(東京順天
堂大学医学部、2008、11) 岩田岳 眼疾患と
感受性遺伝子

第62回国立病院総合医学会(東京、2008、11)
岩田岳 眼疾患バイオマーカーの探索とモ
デル動物を用いた予防・治療薬の開発

(著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等
も記入)

2) 海外

口頭発表

10件

原著論文による発表 2件

それ以外(レビュー等)の発表 0件

そのうち主なもの

論文発表

Masaki.Tanito, Masayoshi.Minami, Masakazu
. Akahori, Sachiko.Kaidzu, Yasuyuki.Takai,
Akihiro.Ohira, Takeshi Iwata. LOXLI
variants in elderly Japanese patients with
exfoliation syndrome/glaucoma, primary
open-angle glaucoma, normal tension
glaucoma, and cataract. Molecular Vision
2008; 14:1898-1905

Sachiko.Kaidzu, Masaki.Tanito,

Akihiro. Ohira,
Shinsuke. Umeda, Michihiro. Suzuki, Yasuhiro. Yoshikawa, Takeshi. Iwata. Immunohistochemical analysis of aldehyde-modified proteins in drusen in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) Experimental Eye Research 86 (2008) 856-859

学会発表

Association for Research in Vision and Ophthalmology, (USA, FORTLAUDERDALE 2008) H. Okamoto, H. Shimada, K. Matsuno, K. Tanahashi, J. Utsmi, T. Iwata. Enrichment and Isolation of Low Molecular Weight Protein in Vitreous Humor Using a Newly Developed Protein Separator.

Association for Research in Vision and Ophthalmology, (USA, FORTLAUDERDALE 2008) A. Seki, T. Yoshida, S. Umeda, M. T. Suzuki, K. Terao, Y. Yoshikawa, T. Iwata. Genome-Wide Linkage Analysis of Cynomolgus Monkey Pedigree With Early-onset Macular Degeneration.

Association for Research in Vision and Ophthalmology, (USA, FORTLAUDERDALE 2008) M. Akahori, C. Oka, T. Iwata. Characterization of the Retina in Htral Deficient Mouse.

Association for Research in Vision and Ophthalmology, (USA, FORTLAUDERDALE 2008) Z-L. Chi, H. Okamoto, M. Suzuki, K. Terao, Y. Yoshikawa, T. Iwata. Characterization of Retinal pigment Epithelium Cells Isolated From Cynomolgus Monkey With Early-onset Macular Degeneration.

XV III International Congress for Eye Research (China, Beijing 2008) Takeshi. Iwata, Zai-Long. Chi, Fumie. yasumoto, Masakazu. Akahori, Minoru. Obazawa, Itaru. Kimura, Naoki. Nakaya, Stanislav. Tomarev. THREE POTENTIAL MOUSE MODEL FOR GLAUCOMA

XV III International Congress for Eye Research (China, Beijing 2008) Itaru. Kimura,

Haru. Okamoto, Zai-Long. Chi, Masayoshi. Minami, Michihiro. Suzuki, Takeshi. Iwata. PROTEOME ANALYSIS OF OCULAR CILIARY BODY

XV III International Congress for Eye Research (China, Beijing 2008) Zai-Long. Chi, Masakazu. Akahori, Minoru. Obazawa, Itaru. Kimura, Naoki. Nakaya, Atanislav. Tomarev. Masaki. Sasaoka, Atsushi. Shimazaki, Kazuhide. Kawasaki, Tetuya. Yamamoto, Takeshi. Iwata. Expression of Mutated optineurin leads to normal tension glaucoma in mice.

Sensory Organs Society for Neuroscience 2008, (USA, Washington DC, 2008) T. Iwata; Z. Chi; F. Yasumoto; M. Minami; M. Obazawa; M. Akahori.

Expression of mutated wdr36 leads to normal tension glaucoma in mice.

Sensory Organs Society for Neuroscience 2008,

(USA, Washington DC, 2008) Z. Chi; M. Akahori; M. Obazawa; I. Kimura; N. Nakaya S. Tomarev; M. Sasaoka. A. Shimazaki; K. Kawase; T. Iwata. Expression of mutated optineurin leads to normal tension glaucoma in mice.

The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting, (USA, San Francisco, 2008) 2008, 12 Takeshi. Iwata, Zai-Long. Chi, Fumie. yasumoto, Masakazu. Akahori, Minoru. Obazawa, Itaru Kimura, Naoki. Nakaya, and Stanislav. Tomarev.

Overexpression of Mutated Optineurin and WDR36 Leads to Normal Tension Glaucoma in Mice.

(著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入)

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

岩田岳 特願 2008-091522

神経障害の検定のための組成物、キットおよび方法

岩田岳 特願 2008-092021
代謝障害を伴う疾患の検定のための組成物、
キットおよび方法

岩田岳 特願 2008-092245
老化、および血管障害を伴う疾患の検定のため
の組成物、キットおよび方法

岩田岳 特願 2008-257469
コラーゲン線維の萎縮による組織障害の検
査のための方法、組成物及びキット

岩田岳 特願 2008-257430
糖尿病性末梢血管障害の検査のための方法、
組成物およびキット

岩田岳 特願 2008-257691
細胞増殖を伴う糖尿病合併症の検査のため
の方法、組成物およびキット

岩田岳 特願 2008-241209
トランスジェニック動物

岩田岳 特願 2008-267716
緑内障のリスクの予測方法

岩田岳 特願 2008-272161
滲出型加齢黄斑変性のリスクの予測方法

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

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

谷戸 正樹

島根大学医学部眼科・講師

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

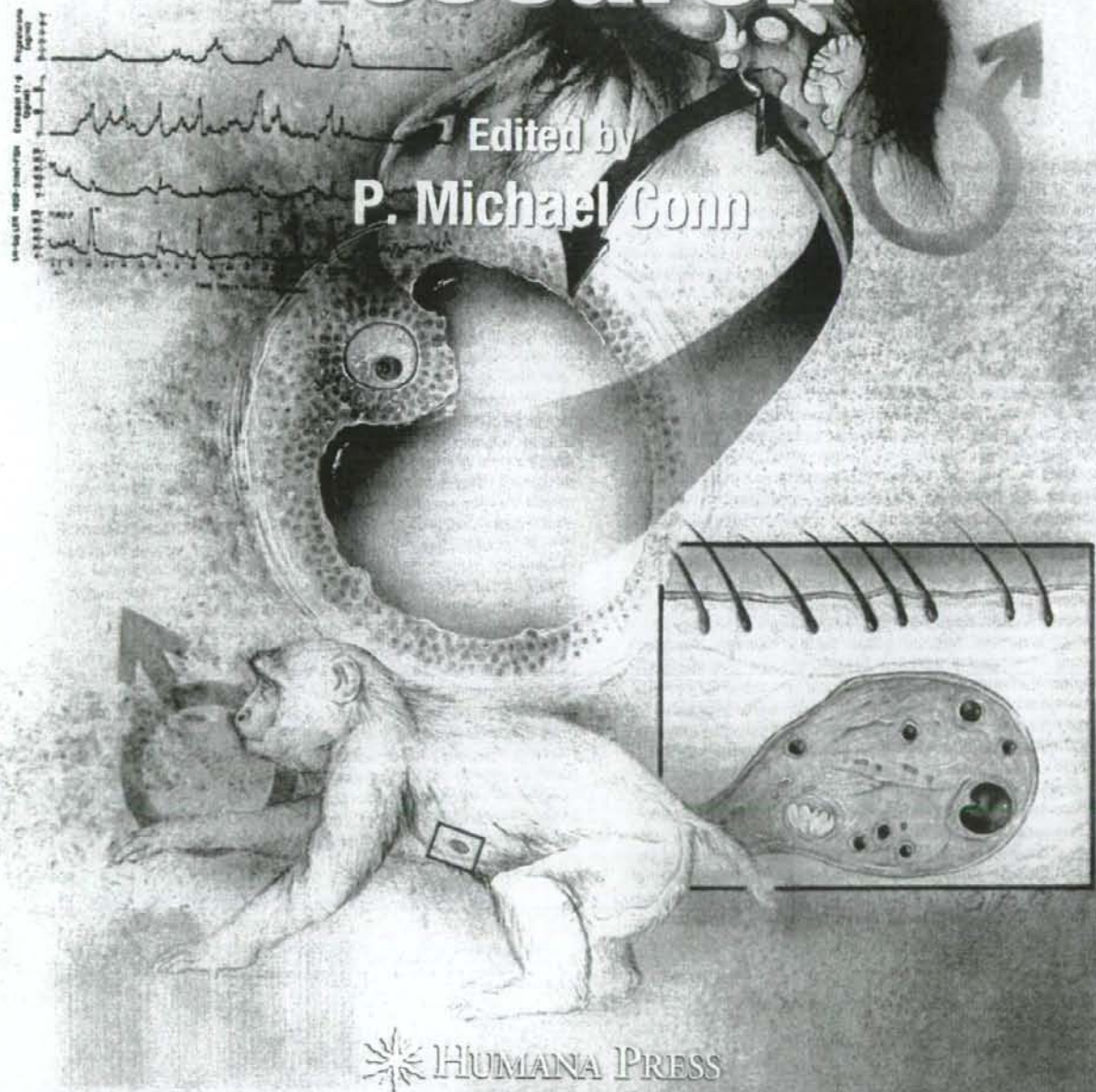
班員名簿（平成21年3月現在）

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 溝田 淳 村上 晶 谷戸 正樹 石田 成弘	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻 順天堂大学医学部浦安病院眼科 順天堂大学医学部眼科 島根大学医学部眼科 参天製薬（株）開発研究センター	教授 准教授 教授 講師 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 E-Mail:wakuishoko@kankakuki.go.jp	秘書
経理事務担当	高橋 周子	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 事務部 企画課 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL: 03-3411-0111 FAX: 03-3411-0366 E-Mail: ShTakahashi@ntmc.hosp.go.jp	事務員

II. 研究成果の刊行物・別刷

Sourcebook of Models for Biomedical Research

Edited by
P. Michael Conn



 HUMANANA PRESS

Sourcebook of Models for Biomedical Research

Edited by

P. Michael Conn, PhD

Associate Director and Senior Scientist, Oregon National Primate Research Center and

Professor of Physiology and Pharmacology and of Cell and Developmental Biology, Oregon Health and Science University, Beaverton, OR

The collection of systems represented in the *Sourcebook of Models for Biomedical Research* reflect the diversity and utility of models that are used in biomedicine. That utility is based on the consideration that observations made in particular organisms will provide insight into the workings of other, more complex systems. Some models have the advantage that the reproductive, mitotic, developmental or aging cycles are rapid compared with those in humans; others are utilized because individual proteins may be studied in an advantageous way and have human homologs. Other organisms are facile to grow in laboratory settings, lend themselves to convenient analyses, have defined genomes or present especially good human models of human or animal disease. The *Sourcebook of Models for Biomedical Research* is a comprehensive and extensive collection of these important medical parallels. While the entire book is not devoted to the remarkable success of the genomic programs, this work is well represented and indexed within these pages. This volume will be an invaluable resource for pharmaceutical and academic researchers across a wide range of biological fields.

- Unique reflection of the diversity and utility of models used in biomedicine
- Novel discussion of reproductive, mitotic, developmental or aging cycles in a range of organisms in comparison with humans
- Insights on how some organisms that are able to grow in laboratory settings or lend themselves to convenient analyses have defined genomes or present especially good human models of human or animal disease
- Uses a range of tables and figures to make comparisons of models so that observations not available in primary publications can become useful to the reader

Contents

I INTRODUCTION. Animal Models for Human Diseases: *An Overview*. Selection of Biomedical Animal Models. Improved Models for Animal Research. **II GENERAL CONSIDERATIONS.** The Ethical Basis for Animal Use in Research. Bibliographic Searching Tools on Disease Models to Locate Alternatives for Animals in Research: *A Website Companion*. NIH Policies on Sharing of Model Organisms and Related Research Resources. Databases for Biomedical Animal Resources. Psychological Enrichment for Animals in Captivity. **III WELL-ESTABLISHED MODELS.** **A. Yeast, Worms, Flies, Sea Animals, and Birds.** Integrated Network Modeling of Molecular and Genetic Interactions. The Sponge as a Model of Cellular Recognition. Sea Urchin Embryo: *A Model System for Analyzing Cellular Activities during Early Development*. *Caenorhabditis elegans* Models of Human Neurodegenerative Diseases: *A Powerful Tool to Identify Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Targets*. Zebrafish as a Model for Development. Zebrafish as a Model for Studying Adult Effects of Challenges to the Embryonic Nervous System. Modeling Cognitive and Neurodegenerative Disorders in *Drosophila melanogaster*. Biomedical Research With Honey Bees. Establishing and Maintaining a *Xenopus laevis* Colony for Research Laboratories. The Chicken as a Model Organism. **B. Rodents.** Rat Knockout and Mutant Models. Rodent Genetics, Models, and Genotyping Methods. The House Mouse in Biomedical Research. Mouse Model for Alzheimer's Disease. Guinea Pigs as Models for Human Cholesterol and Lipoprotein Metabolism. Reliability of Rodent Models. **C. Cats, Dogs, and Pigs.** The Domestic Cat, *Felis catus*, as a Model of Hereditary and Infectious Disease. Swine in Biomedical Research. The Minipig as an Animal Model in Biomedical Stem Cell Research. **D. Nonhuman Primates.** The Nonhuman Primate as a Model for Biomedical Research. Primates as Models of Behavior in Biomedical Research. Primate Models for Understanding Brain Mechanisms of Cognitive Behavior. **V MODELS FOR SPECIFIC PURPOSES.** **A. Visual and Auditory Disease.** Animal Models for Eye Diseases and Therapeutics. Animal Models of Noise-induced Hearing Loss. **B. Trauma, Pain, and Neurology.** Human and Animal Models for the Study of Muscle Pain. Animal Models of Parkinson's Disease. Transgenic Animal Models of Neurodegenerative Diseases. Animal Models of Nociception and Pain. Nonmammalian Models for the Study of Pain. **V MODELS OF BEHAVIOR.** **A. Cardiovascular.** Animal Models of Vascular Development and Endothelial Cell Biology. Models of Behavior: *Cardiovascular*. Animal Models for Atherosclerosis, Restenosis, and

Endovascular Aneurysm Repair. Transgenic Mouse Models of HIV-1/AIDS and Cardiac Performance. **B. Reproduction.** Primate Models for the Assisted Reproductive Technologies and Embryonic Stem Cell Biology. Rat Models of Polycystic Ovary Syndrome. Murine Models for Reproduction. Pig Model to Study Dynamics of Steroids During Ovarian Follicular Growth and Maturation. **C. Drug Development and Research Models.** Molecular Genetic Approach to Identify Inhibitors of Signal Transduction Pathways: *Fission Yeast as a Model System for Drug Discovery*. Yeast as a Model System to Study DNA Damage and DNA Repair. **D. Physiology.** Human Models of Space Physiology. Developmental Space Biology of Mammals: *Concepts and Methods of Study*. A Practical Approach to Animal Models of Sepsis. Animal Models in Functional Magnetic Resonance Imaging. Animal Models in Aging Research: *A Critical Examination*. **E. Genetics.** Gene Targeting in Human Somatic Cells. Animal Models for Investigating the Causes and Mechanisms of Mammalian Germ Cell Aneuploidy. Genetic Models of Alzheimer's Disease. **F. Immunology and Virology.** Rat Models of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Animal Models in Virology. Nonhuman Primate Models for AIDS. **VI MODELS OF OTHER HUMAN DISEASES.** Use of Congenic Mouse Strains for Candidate Disease Gene Identification in Complex Traits. Animal Models of Sudden Infant Death Syndrome. Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder. Animal Models for Studying Fetal Alcohol Syndrome, Alcohol-Related Birth Defects, and Alcohol-Related Neurodevelopmental Disorder. Modeling Drug and Alcohol Abuse: *Experimental Examples of the Utility of Zebrafish*. Mouse Models for Experimental Cancer Therapy. Rat Models of Skin Wound Healing. Animal Models of Prostate Cancer. Animal Models of Diabetes. Animal Models of Kidney Diseases. Animal Models of Multiple Sclerosis. Canine and Feline Models for Cancer. Obese Mouse Models. Study of Polycystic Kidney Disease in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Animal Models of Myofibrosis. Animal Models for Bone Tissue Engineering Purposes. **VII OTHER TOOLS.** Markov Processes for Biomedical Data Analysis. Software Tools for Modeling Biomedical Systems. Developing Websites for Biomedical Research and Training. Building Virtual Research Communities Using Web Technology. Index.

SOURCEBOOK OF MODELS FOR BIOMEDICAL RESEARCH

ISBN: 978-1-58829-933-8

-ISBN: 978-1-59745-285-4

humanapress.com

ISBN 978-1-58829-933-8



Complement Activation of Drusen in Primate Model (*Macaca fascicularis*) for Age-Related Macular Degeneration

Takeshi Iwata

Takeshi Iwata, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization
Tokyo Medical Center, 2-5-1 Higashigaoka, Meguro-ku, Tokyo 152-8902 Japan

1 Introduction

Dysfunction of the visual system can alter normal human life style and lower quality of life. The most prevalent causes of visual impairment worldwide are cataracts, glaucoma, and age-related macular degeneration (AMD). These eye diseases are responsible for 69% of blindness globally. Although cataracts are the leading cause of blindness worldwide, recent advances in cataract surgery has significantly reduced the visual impairments caused by cataracts especially in developed countries. The most prevalent eye disease for elderly Europeans and Americans is AMD. This degenerative disease progresses from retinal deposits called drusen to neovascularization and retinal hemorrhages resulting in irreversible loss of central vision. In spite of the high incidence of AMD, a limited amount of information is available on the underlying pathological mechanisms causing these diseases. Obtaining tissues from the AMD donors is often difficult, and even when obtained, they are usually collected many hours or even days after death. Because of limitation for human tissue, the availability of animal models is becomes valuable because they can be used to investigate the molecular mechanisms of the disease and to test new therapeutic intervention.

The retina is composed of nine layers of neural and glial cells that are arranged concentrically at the posterior pole of the eye. Incoming light is focused on the central area of the retina called the fovea which is located in the center of the macula. In humans, the average size of the macula is only 6 mm in diameter. The outer surface of the retina is covered by a monolayer of retinal pigment epithelial (RPE) cells which forms a diffusion barrier between the neural retina and the choroidal blood supply. The RPE regulates the transport of proteins to the retina, and controls the hydration

and ionic composition of the subretinal space. The physiological condition of the RPE is closely associated with the pathogenesis of AMD.

2 Introduction of AMD

AMD is a blinding disorder characterized by a marked decrease in central vision associated with RPE atrophy with or without choroidal neovascularization (CNV). Many factors including genetic, behavioral, and environmental, are involved in this disease. AMD is characterized by the degeneration of cone photoreceptors in the foveal region of the retina resulting in a decrease of central visual acuity. The progressive impairment of the retinal pigment epithelial (RPE) cells, and damage to Bruch's membrane and choriocapillaris results in retinal atrophy and photoreceptor dysfunction. In some cases, CNV develops, and the new vessels penetrate Bruch's membrane and pass into the subretinal space.

Two types of AMD are recognized; the non-neovascular type is called the dry-type AMD and includes more than 80% of the cases, and the neovascular type is called the wet-type AMD which is progressive with a higher probability of blindness. The prevalence of AMD differs considerably among the different ethnic groups, but the incidence increases with age in all groups. A lower prevalence of AMD has been reported in individuals of African ancestry than of Anglo-Saxon ancestry. Other risk factors for AMD are cigarette smoking, obesity, hypertension, and atherosclerosis.

3 Genetics of AMD

Epidemiological studies have shown that genetic factors play a critical role for AMD. Twin studies have previously shown a higher concordance for AMD in monozygotic twins than in dizygotic twins (Heiba, Elston, Klein, and Klein 1994; Seddon, Ajani, and Mitchell 1997; Hammond, Webster, Snieder, Bird, Gilbert, and Spector 2002). In addition, first degree relatives of individuals with AMD have a higher incidence of AMD over individuals without a family history of AMD. Genetic segregation studies have also shown a genetic effect that accounts for approximately 60% of AMD with a single major gene accounting for about 55% of the risk of developing AMD. Previous data have suggested that the etiology of AMD has a significant genetic component. Only a small proportion of the families with AMD show Mendelian inheritance, and the majority of the individuals inherit AMD in a complex multi-gene pattern. With the help of the haplotype marker project (HapMap Project), genome wide scanning has identified at least 13 loci linked to AMD on different chromosomes (Iyengar, Song, Klein, Klein, Schick, Humphrey, Millard, Liptak, Russo, Jun, Lee, Fijal, and Elston 2004; Schick, Iyengar, Klein, Klein, Reading, Liptak, Millard, Lee, Tomany, Moore, Fijal, and Elston 2003; Majewski, Schultz, Weleber, Schain, Edwards, Matise, Acott, Ott, and Klein 2003). Recently, a polymorphism of complement factor H (CFH) gene (*Y402H*) was shown to be associated with an increased risk for AMD (Klein, Zeiss, Chew, Tsai, Sackler, Haynes, Henning, SanGiovanni, Mane, Mayne, Bracken, Ferris, Ott, Barnstable, and Hoh 2005; Edwards, Ritter, Abel, Manning, Panhuysen, and

Farrer 2005; Haines, Hauser, Schmidt, Scott, Olson, Gallins, Spencer, Kwan, Noureddine, Gilbert, Schnetz-Boutaud, Agarwal, Postel, and Pericak-Vance 2005; Hageman, Anderson, Johnson, Hancox, Taiber, Hardisty, Hageman, Stockman, Borchardt, Gehrs, Smith, Silvestri, Russell, Klaver, Barbazetto, Chang, Yannuzzi, Barile, Merriam, Smith, Olsh, Bergeron, Zernant, Merriam, Gold, Dean, and Allikmets 2005).

These results were confirmed in many of the countries with large Caucasian populations but not in Japan (Okamoto, Umeda, Obazawa, Minami, Noda, Mizota, Honda, Tanaka, Koyama, Takagi, Sakamoto, Saito, Miyake, and Iwata 2006; Gotoh, Yamada, Hiratani, Renault, Kuroiwa, Monet, Toyoda, Chida, Mandai, Otani, Yoshimura, and Matsuda 2006). This gene is located on chromosome 1q25-31 where one of the candidate loci was identified by linkage studies. Another recent study reported that a haplotype association of tandemly located complement 2 and factor B was protective for AMD (Gold, Merriam, Zernant, Hancox, Taiber, Gehrs, Cramer, Neel, Bergeron, Barile, Smith, AMD Genetics Clinical Study Group, Hageman, Dean, Allikmets 2006). HTRA1, a serine protease 11 was recently discovered to be strongly associated with AMD. Unlike the CFH, our study shows strong association with this gene for Japanese AMD patients (Yang, Camp, Sun, Tong, Gibbs, Cameron, Chen, Zhao, Pearson, Li, Chien, Dewan, Harmon, Bernstein, Shridhar, Zabriskie, Hoh, Howes, and Zhang 2006; Dewan, Liu, Hartman, Zhang, Liu, Zhao, Tam, Chan, Lam, Snyder, Barnstable, Pang, and Hoh 2006).

4 Biochemistry of AMD

The early stage of the dry type AMD is characterized by a thickening of Bruch's membrane, aggregation of pigment granules, and increasing numbers of drusen. The thickening of Bruch's membrane obstructs its function as a 'barrier' between the choroid and the RPE that protects the neural retina from the choriocapillary. Drusen are small yellowish-white deposits that are composed of lipids, proteins, glycoproteins, and glycosaminoglycans. They accumulate in the extracellular space and the inner aspects of Bruch's membrane. Drusen are not directly associated with visual loss but represent a risk factor for both the dry-type and wet-type AMD. The classification of hard and soft drusen is based on their size, shape, and color; hard drusen are yellowish with diameters <50 μm and are found in eyes that are less likely to progress to advanced stages of the disease, while soft drusen are darker yellow and larger in size, and are found in eyes more likely to progress to more advanced stages of AMD. A small percentage of dry-type AMD patients progress to the late stage of the wet-type AMD that is characterized by geographic atrophy or detachment of RPE and the development of CNV in the macular region. The presence of a CNV is the factor that most damages the neural retina because the newly developed vessels grow from the choriocapillaris through Bruch's membrane and extend laterally through the RPE cell layer (classic CNV) or extend between the inner Bruch's membrane and RPE (occult CNV). In advanced stages of AMD, the CNV and fluid leaked into the subretinal or intraretinal regions leads to cell death and retinal detachment.

Recent analyses of the progression of drusen have provided important clues that help understand the molecular pathology of AMD. Using both immunohistochemistry