

200828002B

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18-20年度 総合研究報告書

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18-20年度 総合研究報告書

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 山本 哲也 溝田 淳 村上 晶 西村 俊秀 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 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 島根大学医学部眼科 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 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	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. 総合研究報告

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

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. 総合研究報告

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

総合研究報告書

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・室長
分担研究者	三宅 養三	国立病院機構東京医療センター臨床研究センター・センター長
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・助教授
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	島崎 敦	参天製薬(株) 開発研究センター・チームリーダー

研究要旨：緑内障の危険因子として遺伝因子の関与が考えられる。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ブチニューリンと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。

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である。特に緑内障患者の遺伝的背景を把握することは早期診断を可能とし、早期に予防を始めることができる。これまでの遺伝学的研究から欧米人と日本人の遺伝的背景は大きく異なっており、欧米人のデータを日本人にそのまま当てはまらないことが明らかにされている。すなわち、日本人の緑内障については日本人の患者から得られたDNA検体を解析する必要がある。今回我々は多施設共同研究によって収集した緑内障患者DNAを低眼圧緑内障及び高眼圧緑内障に分類し、患者特有の遺伝子多型を選別することを目的に個々の患者100名に対し50万個の遺伝子多型(SNP)を解析し、200名の対照群と比較した。

複数の疾患について血漿組成が微量変化することが報告されており、我々は緑内障早期診断法として遺伝子多型解析に加えて血漿プロテオーム解析を行う。

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(正常眼圧)マウスの作製に世界で初めて成功した。このマウスは緑内障患者と同様な神経乳頭の陥凹や神経節細胞死が観察されている。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、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。本研究事業ではすでに発見されている先天性緑内障遺伝子の改変マウスの作製だけでなく、リスク遺伝子の改変マウスについても作製を試みる。

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・デアセチラーゼの阻害剤、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の効果を数値化するための評価系の確立に取り組む。また、より動物実験に適する大型眼球のラットや霊長類を用いたドラッグデリバリー法の開発を行う。

B. 研究方法

1) 緑内障危険因子（遺伝子多型）に早期診断法の確立：

正常眼圧緑内障と高眼圧緑内障患者の DNA 検体をそれぞれ 250 検体収集する。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（山本 哲也）、順天堂大学医学部眼科教室（村上 晶）、順天堂大学医学部浦安病院眼科（溝田 淳）が参加した。収集 DNA 検体は個々に Affymetrix 社の 50 万 SNP チップあるいは Illumina 社の 50 万 SNP チップを用いて検出を行った。SNP チップのシグナルは患者（100 人）-健常者（100 人）間で比較された後、数ヶ月にわたる統計処理が行われ、緑内障に固有の遺伝子多型が選別された。これらの遺伝子多型（SNP）をさらにグループ化し、ハプロタイプブロックとして疾患との連鎖を解析した。さらに SNP チップ解析に含まれなかった患者 DNA についても解析が継続されている。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蛋白組成に何らかの影響があると考えられ、遺伝子多型解析に加えて緑内障の早期診断を目的とした血漿バイオマーカーの探索を行っている。開放隅角緑内障患者の血漿 50 検体と健常者の 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）によって測定する。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が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ている。

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：

単一の遺伝子の変異による緑内障の原因遺伝子として MYOC、CYP11B1、OPTN、WDR36 の 4 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、そして最近発見された 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、細胞内局在を調べる。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：

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に世界で初めて成功した。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視神経乳頭の陥凹や神経節細胞死が観察された。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う。

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を行いたい。

C. 研究結果

1) 緑内障危険因子 (遺伝子多型) に早期診断法の確立:

多施設共同研究で収集された開放隅角緑内障患者の DNA は Affymetrix 社の 50 万 SNP チップあるいは Illumina 社の 25 万 SNP チップを用いて遺伝子多型解析が行われ、検出シグナルを患者と健常者間で比較された。この結果、緑内障患者に特有の遺伝子多型が複数発見され、統計学的計算を行ったところ緑内障のリスク遺伝子を複数同定することに成功した。これらの遺伝子は緑内障の早期診断に利用できるだけでなく、緑内障の発症に関する重要な情報をもたらす発見につながると考えられる。何れの遺伝子もこれまでに緑内障との関係は明らかにされておらず、今後の機能解析に期待される。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リスク遺伝子の発見に加え、患者血漿蛋白の微量変化を疾患バイオマーカーとして利用するための分析を開始し

た。東レ低分子量分画装置を用いて個々の患者と健常者の血漿検体について 50 KDa 以下の蛋白を分離し、逆相クロマトグラフィーによって分画を行った。クロマトグラムは白内障患者やその他の眼疾患患者とは異なっており、質量分析計によるプロテオーム解析の結果が期待される。

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:

緑内障原因遺伝子ミオシリン (MYOC) を COS-7 細胞で強制発現し、細胞外の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。その結果、コンフルエントな状態の 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 の蛋白構造を明らかにすることは、機能解明や阻害薬開発のための貴重な情報をもたらす。我々は MYOC の結晶化を行うために発現法と精製法を確立したが、結晶化条件を検討中で、まだ結晶を得ていない。結晶化が実現でき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査中である。

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 の変異体 (E50K) を全身で強制発現したマウスを 16 系頭作製した。このマウスは緑内障の特徴である視神経乳頭の陥凹や神経節細胞が観察された。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。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。

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特徴的な遺伝子と蛋白が存在するか調べるために遺伝子多型解析及び血漿プロテオーム解析を行った。この結果、緑内障患者に優位に現れる遺伝子多型が発見された。さらにこれらの遺伝子多型が遺伝子中に複数あることから、緑内障リスク遺伝子であると考えられる。何れの遺伝子もこれまでに報告されてきた単一緑内障原因遺伝子とは異なり、多因子緑内障遺伝子として遺伝子間の関係を明らかにする必要がある。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実験目標である。

単一緑内障遺伝子としてすでに報告されて

いるミオシリン (MYOC)、オプチニューリン (OPTN)、WDR36 の 3 遺伝子についてはその正常機能な疾患こと関係が不明である。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。今回の実験から MYOC は密な NIH3T3 細胞表面に結合できることを発見し、結合相手の同定を急いでいる。こ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 による構造解析を予定している。

我々はオプチニューリンと 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が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。さらに、正常ラット・マウスを使った神経線維の切断・クランプに対しても薬効を評価したい。

効果のあった薬についてはより眼球がよりヒトに類似する霊長類（独立行政法人医薬基盤研究所筑波霊長類医学科学研究センター）を用いて同様に検討を行う。

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複製したところ、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

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.

Izumi K, Kurosaka D, Iwata T, Oguchi Y, Tanaka Y, Mashima Y, and Tsubota K. Involvement of Insulin-like Growth Factor-I and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 in Corneal Fibroblasts during Corneal Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis*

Sci 2006 47:591-598.

Darmanin C, Iwata T, Carper DA, and El-Kabbani O. Discovery of potential sorbitol dehydrogenase inhibitors from virtual screening. *J Med Chem* 2006 59:558-560.

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.

Hasegawa K, Ishida K, Sawada A, Kawase K, Yamamoto T. Diurnal variation of intraocular pressure in suspected normal-tension glaucoma. *Jpn J Ophthalmol.* 2006 50:449-54.

Iwase A, Araie M, Tomidokoro A, Yamamoto T, Shimizu H, Kitazawa Y; Tajimi Study Group. Prevalence and causes of low vision and blindness in a Japanese adult population: the Tajimi Study. *Ophthalmology.* 2006 113:1354-62.

Suzuki Y, Iwase A, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S, Kuwayama Y, Mishima HK, Shimizu H, Tomita G, Inoue Y, Kitazawa Y; Tajimi Study Group.

Risk factors for open-angle glaucoma in a Japanese population: the Tajimi Study. *Ophthalmology.* 2006 113:1613-7.

Miyake T, Sawada A, Yamamoto T, Miyake K, Sugiyama K, Kitazawa Y. Incidence of disc

hemorrhages in open-angle glaucoma before and after trabeculectomy. *J Glaucoma*. 2006 15:164-71.

Kondo N, Sawada A, Yamamoto T, Taniguchi T. Correlation between individual differences in intraocular pressure reduction and outflow facility due to latanoprost in normal-tension glaucoma patients. *Jpn J Ophthalmol*. 2006 50:20-4.

Jo T, Mizota A, Hatano N, Tanaka M. Frosted branch angiitis-like fundus following presumed influenza virus type A infection. *Jpn J Ophthalmol*. 2006 50:563-4.

Adachi-Uehara N, Kato M, Nimura Y, Seki N, Ishihara A, Matsumoto E, Iwase K, Ohtsuka S, Kodama H, Mizota A, Yamamoto S, Adachi-Usami E, Takiguchi M. Up-regulation of genes for oxidative phosphorylation and protein turnover in diabetic mouse retina. *Exp Eye Res*. 2006 83:849-57.

Takizawa Y, Hayashi S, Fujimaki T, Mizota A, Yokoyama T, Tanaka M, Murakami A. Central retinal vein occlusion caused by human herpesvirus 6. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2006 43:176-8.

Jin ZB, Hayakawa M, Murakami A, Nao-i N. RCC1-like domain and ORF15: essentials in RPGR gene. *Adv Exp Med Biol*. 2006;572:29-33.

Jin ZB, Liu XQ, Hayakawa M, Murakami A, Nao-i N. Mutational analysis of RPGR and RP2 genes in Japanese patients with retinitis pigmentosa: identification of four mutations. *Mol Vis*. 2006 12:1167-74.

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. (2007 in press)

Takeshi Iwata and Stanislav Tomarev. *Animal Models for Eye Diseases and Therapeutics*, Source Book of Biomedical Research, Humana Press Inc. (2007 in press)

岩田岳、我が国の先端的眼科研究の立場から—失明を防ぐための多面的なアプローチ、バイオサイエンスとインダストリー 64:625-629 (2006)

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、株式会社メディカル出版 23:1125-1131 (2006)

James Fielding Hejtmancik, Marc Kantorow, and Takeshi Iwata. *Models of Age Related Vision Problems*, pp.812-828 *Handbook of Models for Human Aging*. Academic Press, Elsevier Inc. (2006)

3. 学会

(招待講演)

第17回日本緑内障学会(神戸、2006)
シンポジウム1「房水流出路の不思議に迫る—基礎と臨床—」

岩田岳 「緑内障マウスの分子生物学的解析」

第45回網膜硝子体学会(東京、2006)
シンポジウム1「眼内液・組織から得られる情報」

岩田岳 「硝子体：硝子体液、蛋白」

4th International Conference on Innate Immunity (コルフ島、ギリシャ、2006)
Session VIII Pathophysiology, Plant Immunology

Iwata T, Umeda S, Okamoto H, Mizota A, Suzuki MT, Terao K, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Miyake Y. Complement activation in drusen observed in macular degeneration cynomolgus monkeys

(Macaca Fascicularis): Animal models for age-related macular degeneration.

65th All India Ophthalmological Conference (ハイデラバード、インド、2007) 学会開所式 (インド大統領参加)

「眼科分野におけるインドのグローバル戦力」
Iwata T. "Japan-India Cooperative Scientific Program"

(学会一般演題)

110 回日本眼科学会総会 (大阪、2006) 岩田岳、正常眼圧緑内障マウスの作製とその病理学的及び分子生物学的解析

Association for Research in Ophthalmology and Vision (フォートローダーデール、米国、2006) Iwata T, Umeda S, Okamoto H, Suzuki MT, Terao K, Mizota A, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Miyake Y. Characterization Of Drusen Component And Possible Involvement Of Autoimmunity In Early And Late Onset Macular Degeneration Cynomolgus Monkey (Macaca Fascicularis).

Association for Research in Ophthalmology and Vision (フォートローダーデール、米国、2006) Akahori M, Minami M, Obazawa M, Tomarev S, Nakaya N, Miyake Y, Iwata T. Characterization of Normal Tension Glaucoma Mouse Over Expressing Mutant OPTN (E50K).

Association for Research in Ophthalmology and Vision (フォートローダーデール、米国、2006) Akaza E, Okamoto H, Shimada H, Yuzawa M, Miyake Y, Iwata T. Proteomic Analysis of Posterior Precortical Vitreous Pocket With Peripheral Vitreous From Proliferative Diabetic Retinopathy and Epiretinal Membrane.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (フォートローダーデール、米国、2006) Okamoto H, Umeda S, Suzuki MT, Terao K, Nozawa T, Yoshikawa Y, Miyake Y, Iwata T. Comparative Proteome Analysis of Macula versus Peripheral Retina in Cynomolgus Monkey.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (フォートローダーデール、米国、2006) Shibuya M, Okamoto H, Nozawa T, Tanaka Y, Utsumi J, Reddy VN, Echizen H, Iwata T. Proteome Analysis of Retinal Pigment Epithelial Cells Treated With Growth Promotive Factor; REF-1/TFPI-2.

International Conference for Eye Research (プエノスアイレス、アルゼンチン、2006) Iwata T, Akahori M, Obazawa M, Minami M, Tomarev S, Nakaya N, Miyake Y. Development of normal tension glaucoma mouse by over expression of mutant optineurin (E50K).

XXI International Complement Workshop (北京、中国、2006) Iwata T, Yoshida T, Terao K, Suzuki MT, Mizota A, Yoshikawa Y, Miyake Y. Linkage Analysis of Early Onset Macular Degeneration in Cynomolgus Monkey with Complement Activated Drusen.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1 特許取得	出願中
2 実用新案登録	なし
3 その他	なし

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

総合研究報告書

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、黒人の遺伝的な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バ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を行う。

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二次元的に分画され、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パイオ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 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できれば、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ティンと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 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

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

総合研究報告書

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