

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子の同定
および迅速遺伝子診断キットの開発に
関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水木 信久

平成21（2009）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子の同定および迅速遺伝子診断
キットの開発に関する研究

水木 信久 1

II. 分担研究報告

1. DNA チップによる正常眼圧緑内障感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

伊藤 典彦・太田 正穂・猪子 英俊 4

2. 正常眼圧緑内障迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

上本 理世・西出 忠之・猪子 英俊 10

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 12

IV. 研究成果の刊行物・別刷 13

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
総括研究報告書

正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子の同定および
迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

主任研究者 水木 信久 横浜市立大学医学部眼科学 教授

研究要旨 緑内障は視神経に傷害をきたす進行性の難治性疾患であり、本邦の失明原因の第一位を占める。その有病率は加齢とともに上昇し、40歳以上では5.8%（推定250万人）と高値を示す。緑内障は複数の危険因子（疾患感受性遺伝子）の関与のもとに発症する多因子性遺伝疾患であると考えられており、これらの遺伝情報は疾患罹患率の予測や予防法の確立、疾患感受性遺伝子をターゲットとした新薬の開発を可能にすると考えられる。本研究の目的は本邦に最も多い正常眼圧緑内障（normal tension glaucoma: NTG）の疾患感受性遺伝子を網羅的に同定し、NTGの迅速遺伝子診断キットおよびゲノム創薬の開発を行うことである。平成20年度は遺伝マーカーとしてSNPを用いた全ゲノム網羅的解析（genomewide approach）によるNTGの疾患感受性遺伝子のスクリーニングを行い、NTG感受性遺伝子を網羅的に同定した。また、同定した遺伝因子の重複（組み合わせ）によるNTG発症の相対危険率の有意な増大を見出し、NTG遺伝子診断キットの開発を推進した。

分担研究者

猪子英俊（東海大学医学部基礎医学系
分子生命科学 教授）
太田正穂（信州大学医学部法医学 講師）
伊藤典彦（横浜市立大学医学部眼科学 助教）
西出忠之（横浜市立大学医学部眼科学 助教）
上本理世（横浜市立大学医学部眼科学 助教）

眼圧が正常範囲にあるため、健康診断や通常の眼科の診察では見落とされることも少なくない。また、NTGは本人の自覚症状も少なく、本人が気付かないうちに視神経傷害（視野障害）が進行していることが多いため、NTGの早期発見、早期治療が大切とされている。NTGは危険因子（疾患感受性遺伝子）が多数重なることにより発症する多因子疾患であると考えられており、NTGの疾患感受性遺伝子を網羅的に同定し、それらの情報をもとに迅速遺伝子診断キットおよびゲノム創薬（分子標的薬）を開発することは、NTGの早期発見・早期治療、あるいは患者個人の特性に応じた診断・治療といったテーラーメイド医療へとつながり、医学的価値は大変に高いといえる。

本研究課題では、遺伝的多型を用いた相関解析により、NTGの疾患感受性遺伝子および疾患特異的変異の網羅的な同定を目指している。その後、得られた遺伝情報をもとにNTGの迅速遺伝子診断キットおよびゲノム創薬の開発を行いたいと考えている。

B. 研究方法

1) DNAチップによるNTG感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

本研究では、Affymetrix社のGeneChip® mapping 500kアレイを用いて、50万以上のSNPをハイスループットに解析することで、全ゲノムを網羅的にスクリーニングする。実験方法はAffymetrix社

A. 研究目的

緑内障は視神経に傷害をきたす進行性の難治性疾患である。放置すると視野狭窄が進行し、失明に至ることのある疾患で、本邦の失明原因の第一位を占めている。緑内障の有病率は加齢とともに上昇し、40歳以上では緑内障全体で5.8%と高値を示し、患者数は250万人以上ともいわれる。緑内障では一度失った視野（死んだ細胞）は回復することはないため、その治療の基本は進行予防、進行抑制であり、早期発見、早期治療が非常に重要である。緑内障は正常視機能を維持できる健常眼圧以上の眼圧上昇のために、視神経が圧迫され、視野狭窄が生じると考えられており、眼圧の上昇が緑内障診断の重要な基準となっている。しかしながら、眼圧が正常範囲にあるにも関わらず、視野狭窄を来す正常眼圧緑内障（normal tension glaucoma: NTG）というタイプが存在し、本邦ではそのNTGが最も高頻度に存在することが明らかになっている（2002年多治見スタディ）。NTGは

のプロトコルを準拠して行い、得られた結果から SNP ごとに患者群と健常群の対立遺伝子分布を統計学的に解析し、疾患と相関する遺伝子変異の決定を行う。

2) NTG 迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

1)により同定した複数の NTG 感受性遺伝子の本病発症に対する相対的寄与を規定し、複数の遺伝子および遺伝子領域の重複(組み合わせ)により本病発症のリスクを有意に増大させるかを検討する。また、安価かつ迅速に NTG 感受性遺伝子内の SNP 判定が行える診断システムおよびキットの開発を行う。

(倫理面への配慮)

すべての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報は連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

C. 研究結果

1) DNA チップによる NTG 感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

NTG 患者 305 検体、健常者 355 検体について Affymetrix 社 GeneChip® mapping 500k アレイを用いた SNP タイピングを終了した。SNP の call rate (解析が適切に行われた SNP の割合)は平均 95% 以上と良好な精度を示した。統計解析の結果、18,039 個の SNP が P 値 0.05 未満の陽性を示した。疾患とより顕著な相関を示す P 値 0.0001 未満では 27 個の SNP が陽性を示した。

2) NTG 迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

同定した複数の NTG 感受性遺伝子内の疾患特異的な感受性 SNP による疾患発症に対する相加・相乗作用を算出し、これら NTG 感受性 SNP の重複(組み合わせ)による NTG 発症の相対危険率の有意な増大を見出した。

また、等温増幅法の一つである Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を改良した low resolution タイピング法を開発した。この方法では SYBR Green I 存在下で増幅を行い、蛍光強度の増大を検出することにより、30~60 分の増幅でタイピング可能であった。また、等温で増幅を行った

後に SYBR Green I を加えることにより、目視でもタイピング可能であった。このタイピング法をプラスチック基板上で行った場合も、その特異性を確認できた。

D. 考察

1) DNA チップによる NTG 感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

NTG 患者 305 検体、健常者 355 検体について Affymetrix 社の GeneChip® mapping 500k アレイを用いて、全ゲノムを網羅的に解析し、良好な結果が得られた。今後、同定された NTG 感受性 SNP を対象に日本人および他人種の追加検体を用いて多型解析を行い、再現性を検討する必要がある。

2) NTG 迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

同定した複数の NTG 感受性 SNP の重複(組み合わせ)による NTG 発症の相対危険率の有意な増大を見出している。したがって、NTG 感受性 SNP を利用した NTG 遺伝子診断キットの開発が期待され、その社会性・市場性は大変高いと考えている。

E. 結論

遺伝マーカーとして SNP を用いたゲノムワイドな相関解析が日本人 NTG 患者 305 検体、健常者 355 検体において終了し、良好なデータが得られている。今後、日本人および他人種の NTG 検体を対象に解析を行い、再現性を確かめ、遺伝要因が多数重なることにより発症すると考えられる NTG の疾患感受性遺伝子を明確にしていきたい。さらに、高齢化社会の到来とともに懸念される NTG 患者数の増加を踏まえ、本研究により得られる遺伝情報をもとに NTG の迅速遺伝子診断キットを作成し NTG の早期発見、早期治療に活用していきたい。また、最終的にはそれらの遺伝情報をもとに、NTG の分子遺伝学的発症機序を解明し、ゲノム創薬へと繋げることで、NTG の根治治療への道を開いていきたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shibuya E, Meguro A, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y,

- Iwase A, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(10):4453-4457, 2008.
- 2) Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 92: 1293-1296, 2008.
- 3) Nomura N, Nomura M, **Mizuki N**, Hamada J: Rac1 mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced migration of glioblastoma cells via paxillin. *Oncol Rep* 20(4): 705-711, 2008.
- 4) Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*, 67(5):725-727, 2008.
- 5) Kirino Y, Takeno M, Watanabe R, Murakami S, Kobayashi M, Ideguchi H, Ihata A, Ohno S, Ueda A, **Mizuki N**, Ishigatubo Y: Association of reduced HO-1 with excessive TLR4 expression in peripheral blood mononuclear cells of Behcet's disease. *Arthritis Res Ther* 10(1): R16, 2008.
- 6) Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, **Mizuki N**: A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. *Cornea* 27(6): 699-705, 2008.
- 7) Akahoshi M, Ishihara M, Namba K, Kitaichi N, Ando Y, Takenaka S, Ishida T, Ohno S, **Mizuki N**, Nakashima H, Shirakawa T: Mutation screening of the CARD15 gene in sarcoidosis. *Tissue Antigens*. 71(6): 564-567, 2008.
- 8) Asukata Y, Ishihara M, Hasumi Y, Nakamura S, Hayashi K, Mochizuki M, Ohno S, **Mizuki N**: Guideline for the diagnosis of ocular sarcoidosis. *Ocular Immunol Inflam*, 16(3): 77-81, 2008.
- 9) Uemoto R, **Mizuki N**: Spontaneous closure of a macular hole caused by a ruptured retinal arteriole macroaneurysm. *Eur J Ophthalmol*, 18(3): 462-465, 2008.
- 10) Tsuchiya AK, Tanaka K, Sakurada I, Oba S, **Mizuki N**: Ultrasound biomicroscopic measurement of anterior chamber biometry between before and after pupil dilation in children. *Eur J Ophthalmol* 18(4): 532-539, 2008.
- 11) Takemoto Y, Naruse T, Numba K, Kitaichi N, Ota M, Shindo Y, **Mizuki N**, Gul A, Madanat W, Shams H, Davatchi F, Inoko H, Ohno S, Kimura A: Re evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 72(4):347-353, 2008.
- 12) Yasuoka H, Yamaguchi Y, **Mizuki N**, Nishida T, Kawakami Y, Kuwana M: Preferential activation of circulating CD8⁺ and gammadelta T cells in patients with active Behcet's disease and HLA-B51. *Clin Exp Rheumatol* 26(4 Suppl 50):S59-63, 2008.
- 13) Nishizaki R, Ota M, Inoko H, Meguro A, Shiota T, Okada E, Mok J, Oka A, Ohno S, **Mizuki N**: New susceptibility locus for high myopia is linked to the uromodulin-like 1 (UMODL1) gene region on chromosome 21q22.3. *Eye* 23(1):222-229, 2009.
- 14) Tomiyama R, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Nishide T, Uemoto R, Iijima Y, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Investigation of association between TLR2 gene polymorphisms and Behcet's disease in Japanese patients. *Human Immunol* 70(1): 41-44, 2009.
- 15) Kamio M, Meguro A, Ota M, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Investigation of the association between the GLC3A locus and normal tension glaucoma in Japanese patients by microsatellite analysis. *Clinical Ophthalmol* 3: 183-188, 2009.
- 16) Nakamura K, Ota M, Meguro A, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, **Mizuki N**: Association of microsatellite polymorphisms of the GPDS1 locus with normal tension glaucoma in the Japanese population. *Clinical Ophthalmol* 3: 307-312, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請

名称: 正常眼圧緑内障疾患感受性遺伝子及びその利用, 出願番号: 特願 2008-302986, 出願日: 2008/11/27, 出願人: 横浜市立大学, 発明者: 木本信久

厚生労働科学研究費補助金 (感覚器障害研究事業)
分担研究報告書

DNA チップによる正常眼圧緑内障感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

分担研究者 伊藤 典彦 横浜市立大学医学部眼科学 助教
 分担研究者 太田 正穂 信州大学医学部法医学 講師
 分担研究者 猪子 英俊 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授

研究要旨 緑内障は遺伝的多型のある多くの危険因子 (疾患感受性遺伝子) が多数重なることにより発症する多因子疾患であると考えられている。現在、緑内障の疾患感受性遺伝子として MYOC 遺伝子、OPA1 遺伝子、OPTN 遺伝子などが報告されているが、いずれの遺伝子も緑内障患者の数%にしか見られず、日本人においてはほとんど相関を示さない。すなわち、現時点では緑内障感受性遺伝子の有力な候補遺伝子は同定されていない。本研究では日本人に多い正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子を同定するために、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて疾患感受性遺伝子の全ゲノム網羅的な SNP 解析を行っている。

A. 研究目的

緑内障とは正常視機能を維持できる健常眼圧以上の眼圧上昇のために、視神経に傷害を来す進行性の難治性疾患である。放置すると視野狭窄が進行し、失明することのある疾患で、本邦の失明原因の第一位を占めている。緑内障全体では 40 歳以上の罹患率は 5.78% であり、全国の潜在患者総数は 200 万人以上ともいわれる。緑内障には色々な病型があるが、なかでも眼圧が正常範囲にあるにも関わらず視神経傷害、視野狭窄が進行してしまう正常眼圧緑内障 (NTG) は特に日本人に多く、その頻度は 40 歳以上の約 4% と考えられている (2002 年多治見スタディ)。NTG は眼圧が正常範囲にあるため、眼圧検査では発見することが困難であり、健康診断や通常の眼科検査では見落とされがちである。また、一度傷ついた視神経は回復することがないため、NTG においては早期発見・早期治療が大変大切であるが、NTG は徐々に進行するため自覚症状に乏しく、本人も気づかないうちに視神経傷害 (視野狭窄) が進行していることも少なくない。

NTG は多くの遺伝要因が多数重なることにより発症の危険度が増大する多因子疾患であると考えられている。NTG の疾患感受性遺伝子を同定し、それをもとに迅速遺伝子診断キットを開発することで、NTG の早期発見については早期診断に繋がることが期待される。現在までに NTG を含む緑内障の疾患感受性遺伝子として MYOC 遺伝子、OPA1 遺伝子や OPTN 遺伝子などが報告されているが、いずれも緑内障患者の数%にしか見られず、日本人においてはほとんど相関を示さない。したがっ

て、私達は NTG の疾患感受性遺伝子を網羅的に同定するため、Affymetrix 社の GeneChip Mapping 500k Array set を用いて、50 万以上の SNP をハイスループットに一度に解析を行うことで、全ゲノム領域を対象とした網羅的な遺伝子スクリーニングを行っている。

B. 研究方法

疾患感受性遺伝子のスクリーニング法として Affymetrix 社 GeneChip の Human Mapping 500k Array set (500,568 個の SNP) を用いた SNP 解析を行った。Gene Chip の Mapping 500k Array set は 2 枚の高密度オリゴヌクレオチドアレイ (250k Array)、NspI と StyI からなり、各アレイは平均 25 万 SNP をジェノタイピングすることが可能である。Mapping 500k set の全ての SNP は厳密なスクリーニングと評価実験を受けている。1 度の実験で 50 万以上の SNP のジェノタイピングを行えることから、全ゲノムの網羅的な解析ツールとして有用である。

横浜市立大学ほか共同研究医療機関において年齢、眼圧、屈折異常など厳密なクライテリアを満たした NTG 患者サンプルを収集した。QIAamp DNA Blood Maxi Kit を用いて DNA を抽出した。DNA チップの解析方法は Affymetrix 社のプロトコールの準拠して行った。まず、PicoGreen 定量キット (PicoGreen ds DNA Quantification Reagent and Kit 200-2000 assay) を用いて DNA 濃度を定量し、各サンプルの DNA 濃度が 250/50 μ l になるように調製した。その後、全ゲノムを制限酵素で切断し、4 塩基の特異的突出末端を認識するアダプターをラ

イグレーションした。アダプターを付加した DNA 断片を PCR で増幅し、フラグメント化して標識した後、Mapping 250k Array にハイブリダイゼーションさせた。蛍光で染色し、レーザースキャナーで各プローブの蛍光強度から各 SNP の対立遺伝子を Direct Model (DM) Algorithm (DM アルゴリズム) を用いて解析を行った。得られた結果から SNP ごとに患者群と健常群の対立遺伝子分布を統計学的に解析し、疾患と相関する遺伝子の決定を行う。統計解析の対象となる SNP はハーディ・ワインバーグ平衡 ($P < 0.001$) にあり、call rate (解析が適切に行われた SNP の割合) が 95% 以上でマイナーアリル頻度が 5% 以上の SNP とした (クオリティーチェック)。実験精度とコンタミネーションの評価は modified partitioning around methods (MPAM) algorithm (MPAM アルゴリズム) にて行った。

(倫理面への配慮)

すべての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報は連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

C. 研究結果

NTG 患者 305 検体、健常者 355 検体について Affymetrix 社 GeneChip[®] mapping 500k アレイ (500,568 個の SNP) を用いた SNP タイピングを終了した。500,568 個の SNP のうち、325,947 個の SNP がクオリティーチェックを満たした。これら 325,947 個の SNP について統計解析を行った結果、18,039 個の SNP が P 値 0.05 未満の陽性を示した。疾患とより顕著な相関を示す P 値 0.0001 未満では 27 個の SNP が陽性を示した (表 1)。

27 個の SNP ($P < 0.0001$) のうち、2 番染色体と 6 番染色体に位置する遺伝子領域にて複数の陽性 SNP が観察された (図 1、2)。これら 2 遺伝子 (仮称: A、B) の発現は感受性 SNP の保有に比例し、有意な増大を示した (図 3A、B)。

D. 考察

私達は老化等の外的要因による影響を除いた遺伝的要因の強い NTG を対象とするため、通常の NTG の診断基準よりも数段厳しい診断基準を課して NTG をより純粋な単一疾患に絞り込んだ後、全染色体の網羅的解析を行ってきた。その結果、遺伝的寄与の顕著な NTG 感受性遺伝子を複数同

定した。特に 2 番および 6 番染色体に位置する NTG 感受性遺伝子の NTG 発症に対する寄与度は極めて高いことが推測される。今後、同定された遺伝子内の感受性 SNP を対象に日本人および他人種の追加検体を用いて多型解析を行い、再現性を検討する必要がある。また、NTG 感受性遺伝子の機能解析を行うことで NTG の病態および発症機序の解明が期待される。

E. 結論

NTG は神経節細胞のアポトーシスにより視神経が傷害される進行性の難治性疾患である。NTG で失った視野は回復せず、本邦の失明原因の第 1 位を占める。私達は既に NTG の感受性遺伝子とほぼ確実と考えられる複数の遺伝子を同定している。本研究を推進することにより、これらの NTG 感受性遺伝子が直接的に証明・確定され、NTG の病態や発症機序の解明に大きく貢献すると考えられる。また、これらの責任タンパク反応系のいずれかを阻害するモノクローナル抗体、酵素阻害剤、結合ペプチドは、従来の眼圧下降を主とした NTG 治療薬とは全く異なる治療薬の開発へとつながる可能性がある。また、同定した遺伝情報をもとに NTG の迅速遺伝子診断法を確立することは、NTG 患者の早期診断・早期治療を可能にし、NTG の重症化による失明者や重度の視覚障害者の減少につながり、医学的および社会的価値は大変高いといえる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shibuya E, Meguro A, **Ota M**, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, **Inoko H**, Mizuki N: Association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 49(10):4453-4457, 2008.

2) Akiyama M, Yatsu K, **Ota M**, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, **Inoko H**, Mizuki N: Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma. Br J Ophthalmol 92: 1293-1296, 2008.

3) Meguro A, **Ota M**, Katsuyama Y, Oka A, Ohno S,

Inoko H, Mizuki N: Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*, 67(5):725-727, 2008.

5) Takemoto Y, Naruse T, Numba K, Kitaichi N, **Ota M**, Shindo Y, Mizuki N, Gul A, Madanat W, Shams H, Davatchi F, Inoko H, Ohno S, Kimura A: Re evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 72(4):347-353, 2008.

6) Nishizaki R, **Ota M**, **Inoko H**, Meguro A, Shiota T, Okada E, Mok J, Oka A, Ohno S, Mizuki N: New susceptibility locus for high myopia is linked to the uromodulin-like 1 (UMODL1) gene region on chromosome 21q22.3. *Eye* 23(1):222-229, 2009.

7) Tomiyama R, Meguro A, **Ota M**, Katsuyama Y, Nishide T, Uemoto R, Iijima Y, Ohno S, **Inoko H**, Mizuki N: Investigation of association between TLR2 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. *Human Immunol* 70(1): 41-44, 2009.

8) Kamio M, Meguro A, **Ota M**, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, **Inoko H**, Mizuki N: Investigation of the association between the GLC3A locus and normal tension glaucoma in Japanese patients by microsatellite analysis. *Clinical Ophthalmol* 3: 183-188, 2009.

9) Nakamura K, **Ota M**, Meguro A, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, **Inoko H**, Mizuki N: Association of microsatellite polymorphisms of the GPDS1 locus with normal tension glaucoma in the Japanese population. *Clinical Ophthalmol* 3: 307-312, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請

名称: 正常眼圧緑内障疾患感受性遺伝子及びその利用, 出願番号: 特願 2008-302986, 出願日: 2008/11/27, 出願人: 横浜市立大学, 発明者: 水木信久

表 1. $P < 0.0001$ を示す 27 個の陽性 SNP

SNP ID	Chr.	MAF	P value	OR (95%CI)
SNP2-1	2	0.13	6.24×10^{-6}	0.46 (0.32-0.67)
SNP2-2	2	0.13	2.50×10^{-9}	0.36 (0.25-0.51)
SNP2-3	2	0.11	6.22×10^{-6}	0.42 (0.28-0.64)
SNP2-4	2	0.12	4.14×10^{-6}	0.43 (0.29-0.64)
SNP2-5	2	0.11	2.54×10^{-6}	0.41 (0.27-0.61)
SNP2-6	2	0.14	2.97×10^{-5}	0.50 (0.35-0.71)
SNP2-7	2	0.12	9.70×10^{-5}	0.50 (0.34-0.74)
SNP2-8	2	0.23	5.32×10^{-5}	0.59 (0.78-0.44)
SNP3-1	3	0.05	7.08×10^{-5}	3.37 (1.78-6.37)
SNP3-2	3	0.05	4.43×10^{-5}	3.46 (1.83-6.52)
SNP4-1	4	0.37	3.97×10^{-5}	1.70 (1.32-2.18)
SNP6-1	6	0.32	9.64×10^{-5}	1.68 (1.30-2.19)
SNP6-2	6	0.34	3.60×10^{-5}	1.75 (1.35-2.29)
SNP6-3	6	0.11	1.63×10^{-5}	0.41 (0.27-0.62)
SNP6-4	6	0.46	4.14×10^{-6}	0.59 (0.46-0.75)
SNP6-5	6	0.34	6.85×10^{-5}	1.60 (1.24-2.07)
SNP6-6	6	0.32	7.78×10^{-5}	1.62 (1.24-2.10)
SNP6-7	6	0.31	7.75×10^{-5}	1.62 (1.24-2.11)
SNP6-8	6	0.35	5.33×10^{-5}	1.64 (1.25-2.13)
SNP6-9	6	0.35	6.72×10^{-5}	1.62 (1.25-2.10)
SNP6-10	6	0.35	5.33×10^{-5}	1.63 (1.26-2.11)
SNP6-11	6	0.31	7.79×10^{-5}	1.64 (1.25-2.13)
SNP6-12	6	0.09	4.69×10^{-5}	2.73 (1.67-4.47)
SNP7-1	7	0.41	6.26×10^{-5}	1.66 (1.30-2.13)
SNP7-2	7	0.36	1.02×10^{-5}	1.81 (1.39-2.35)
SNP11-1	11	0.12	4.41×10^{-5}	2.24 (1.51-3.32)
SNP11-2	11	0.27	2.80×10^{-5}	1.80 (1.37-2.38)

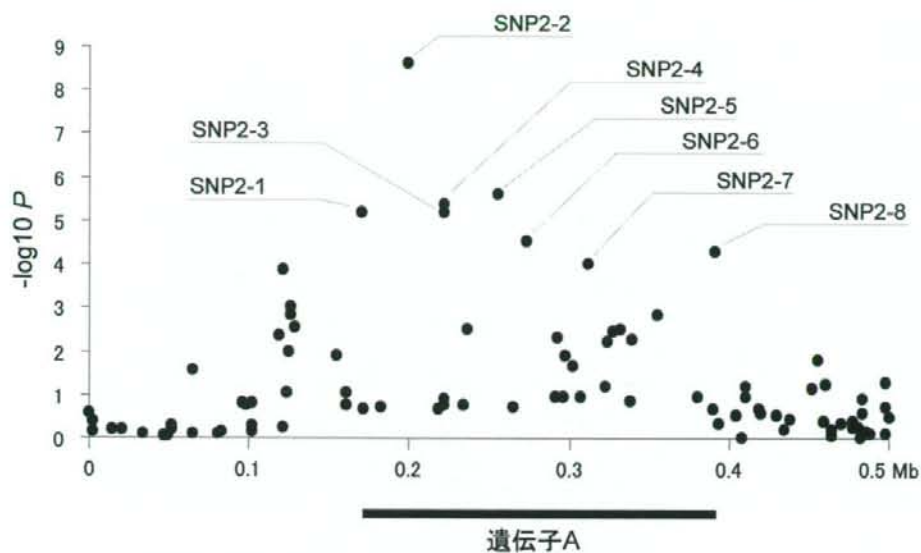


図1. 2番染色体のA遺伝子領域上のSNP分布

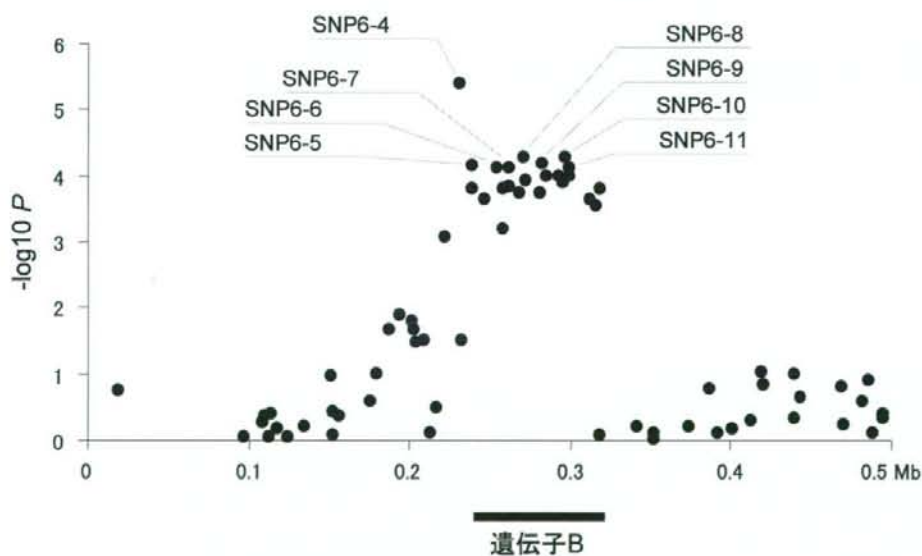


図2. 6番染色体のB遺伝子領域上のSNP分布

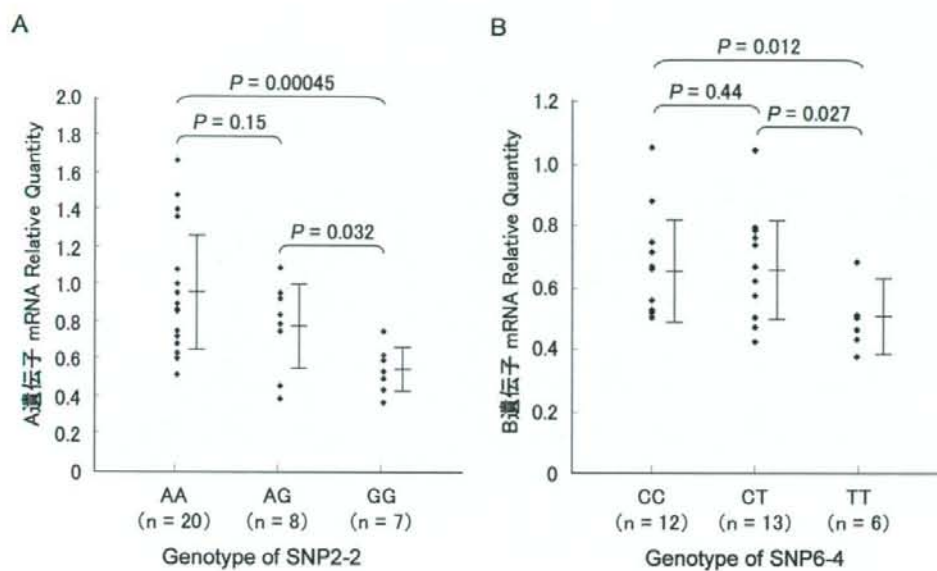


図3. 感受性SNPの遺伝子型によるA遺伝子およびB遺伝子のmRNAの発現量の比較

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

正常眼圧緑内障迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

分担研究者 上本 理世 横浜市立大学医学部眼科学 助教
 分担研究者 西出 忠之 横浜市立大学医学部眼科学 助教
 分担研究者 猪子 英俊 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授

研究要旨 多因子疾患であると考えられる緑内障の発症を左右する危険因子（疾患感受性遺伝子）は未だ明確に決定されておらず、疾患の予防および早期発見・早期治療は遅々として進展していない。本研究では、DNA チップを用いた網羅的遺伝子解析により同定された疾患感受性遺伝子の情報をもとに正常眼圧緑内障迅速遺伝子診断キットの開発を試みる。

A. 研究目的

緑内障は多くの危険因子（疾患感受性遺伝子）が多数重なることにより発症の危険度が増大する多因子疾患であると考えられている。緑内障では一度失った視野（死んだ細胞）は回復することはないため、その治療の基本は進行予防、進行抑制であり、早期発見、早期治療が非常に重要である。従来、緑内障は眼圧の上昇により視神経が圧迫され、視野狭窄が生じると考えられており、眼圧の上昇が緑内障診断の重要な基準となっている。しかしながら、眼圧の上昇に伴わず、視野狭窄を来す正常眼圧緑内障（NTG）も存在し、近年の緑内障疫学調査により日本人ではNTGが最も高頻度に存在することが明らかになっている。NTGは眼圧が正常範囲にあるため、健康診断や通常の眼科の診察では見落とされることも少なくない。また、NTGは本人の自覚症状も少なく、本人が気付かないうちに視神経障害（視野障害）が進行していることが多いため、NTGの迅速な診断の確立が必要とされる。緑内障は危険因子（疾患感受性遺伝子）が多数重なることにより発症する多因子疾患であると考えられており、NTGの疾患感受性遺伝子を同定し、それをもとに迅速遺伝子診断キットを開発することは、NTGの早期発見については早期治療へとつながり、医学的価値は非常に高いといえる。

本研究ではDNAチップを用いた網羅的遺伝子解析により同定された感受性遺伝子の情報をもとにNTG迅速遺伝子診断キットの作成を推進する。

B. 研究方法

1) 同定した NTG 感受性遺伝子を用いた迅速診断キット作成のシミュレーション

DNA チップを用いた NTG 感受性遺伝子の網羅的解析により同定した複数の NTG 感受性 SNP の本病発症に対する相対的寄与を規定し、複数の NTG 感受性 SNP の重複（組み合わせ）により本病発症のリスクを有意に増大させるかを検討する。発症リスクの算定にはオッズ比を用いる。

2) 簡便な SNP 診断システムの開発

安価かつ迅速に NTG 感受性遺伝子内の SNP 判定が行える診断システムおよびキットの開発を行う。等温増幅法の一つである Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を応用する。

C. 研究結果

1) 同定した NTG 感受性遺伝子を用いた迅速診断キット作成のシミュレーション

DNA チップを用いた網羅的遺伝子解析により同定した複数の NTG 感受性 SNP の組み合わせによる NTG 発症の相対危険率の有意な増大（相加・相乗作用）が認められた。

2) 簡便な SNP 診断システムの開発

等温増幅法の一つである LAMP 法を改良した low resolution タイピング法を開発した。この方法では SYBR Green I 存在下で増幅を行い、蛍光強度の増大を検出することにより、30～60 分の増幅でタイピング可能であった。また、等温で増幅を行った後に SYBR Green I を加えることにより、目視でもタイピング可能であった。このタイピング法をプラスチック基板上で行った場合も、その特異性を確認できた。本法は、プラスチック基板

上で等温増幅反応と発色反応を行うことにより singleplex では特異性が保たれ、タイピングが可能であることが分かった。

D. 考察

1) 同定した NTG 感受性遺伝子を用いた迅速診断キット作成のシミュレーション

NTG 感受性 SNP の組み合わせによる NTG 発症の相対危険率の有意な増大 (相加・相乗作用) を見出した。しかしながら、感受性 SNP の組み合わせから相対危険率をより正確に予測・定量するアルゴリズムは構築されていない。今後、相乗モデル (multiplicative model) と相加モデル (additive model) を基に感受性 SNP の組み合わせから相対危険率予測アルゴリズムを作成する必要がある。

2) 簡便な SNP 診断システムの開発

安価かつ迅速な SNP 診断システムの開発を目的とする LAMP 法を改良した low resolution タイピング法の有効性が確認された。今後、これらに tag を付けたプローブを用いて行うことより multiplex 化および、SNP 検出への適用を行う。

E. 結論

NTG は本人の自覚症状も少なく、本人が気付かないうちに視神経障害 (視野障害) が進行していることが多いため、NTG の迅速な診断の確立が必要とされる。NTG 感受性 SNP の組み合わせにより NTG 発症のリスクが有意に増大したことから、本研究事業にて同定された感受性遺伝子の情報は NTG の迅速診断に有効であるといえる。NTG の迅速遺伝子診

断キットが開発されれば、健康診断などで迅速に NTG の遺伝子診断が可能になる。これにより、①将来自分が NTG になる確率 (相対危険率) を事前に知ることが可能となる。相対危険率が何倍の NTG 危険因子を何個所持するというを事前に知ることができれば、本人および医療関係者に与える医学的価値は極めて高い。②NTG の早期診断により、早期の治療が可能になるため、NTG の重症化や失明に至る症例を減少させることが可能となる。すなわち、重症の視覚障害者を減少させることになり、患者本人の QOL の向上のみならず、患者が労務継続可能となることによる社会経済効果、また保健医療、社会保障のコスト削減など社会的にも経済的にも貢献度は大変高いと考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請

名称: 正常眼圧緑内障患者感受性遺伝子及びその利用, 出願番号: 特願 2008-302986, 出願日: 2008/11/27, 出願人: 横浜市立大学, 発明者: 水木信久

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shibuya E, Meguro A, Ota M, et al.	Association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma	Invest Ophthalmol Vis Sci	49(10)	4453-4457	2008
Akiyama M, Yatsu K, Ota M, et al.	Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma	Br J Ophthalmol	92	1293-1296	2008
Nomura N, Nomura M, Mizuki N, et al.	Rac1 mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced migration of glioblastoma cells via paxillin	Oncol Rep	20(4)	705-711	2008
Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, et al.	Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behçets disease	Ann Rheum Dis	67(5)	725-727	2008
Kirino Y, Takeno M, Watanabe R, et al.	Association of reduced HO-1 with excessive TLR4 expression in peripheral blood mononuclear cells of Behçet's disease	Arthritis Res Ther	10(1)	R16	2008
Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, et al.	A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation	Cornea	27(6)	699-705	2008
A kahoshi M, Ishihara M, Namba K, et al.	Mutation screening of the CARD15 gene in sarcoidosis	Tissue Antigens	71(6)	564-567	2008
Asukata Y, Ishihara M, Hasumi Y, et al.	Guideline for the diagnosis of ocular sarcoidosis	Ocular Immunol Inflamm	16(3)	77-81	2008
Uemoto R, Mizuki N	Spontaneous closure of a macular hole caused by a ruptured retinal arteriole macroaneurysm	Eur J Ophthalmol	18(3)	462-465	2008
Tsuchiya AK, Tanaka K, Sakurada I, et al.	Ultrasound biomicroscopic measurement of anterior chamber biometry between before and after pupil dilation in children	Eur J Ophthalmol	18(4)	532-539	2008
Takemoto Y, Naruse T, Numba K, et al.	Re evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behçet's disease	Tissue Antigens	72(4)	347-353	2008
Yasuoka H, Yamaguchi Y, Mizuki N, et al.	Preferential activation of circulating CD8 ⁺ and gammadelta T cells in patients with active Behçet's disease and HLA-B51	Clin Exp Rheumatol	26(4 Suppl 50)	S59-63	2008
Nishizaki R, Ota M, Inoko H, et al.	New susceptibility locus for high myopia is linked to the uromodulin-like 1 (UMODL1) gene region on chromosome 21q22.3	Eye	23(1)	222-229	2009
Tomiyama R, Meguro A, Ota M, et al.	Investigation of association between TLR2 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients	Human Immunol	70(1)	41-44	2009
Kamio M, Meguro A, Ota M, et al.	Investigation of the association between the GLC3A locus and normal tension glaucoma in Japanese patients by microsatellite analysis	Clinical Ophthalmol	3	183-188	2009
Nakamura K, Ota M, Meguro A, et al.	Association of microsatellite polymorphisms of the GPDS1 locus with normal tension glaucoma in the Japanese population	Clinical Ophthalmol	3	307-312	2009

Association of Toll-like Receptor 4 Gene Polymorphisms with Normal Tension Glaucoma

Etsuko Shibuya,^{1,2} Akira Meguro,^{1,2} Masao Ota,³ Kenji Kasbiwagi,⁴ Fumibiko Mabuchi,⁴ Hiroyuki Iijima,⁴ Kazubide Kawase,⁵ Tetsuya Yamamoto,⁵ Makoto Nakamura,⁶ Akira Negi,⁶ Takeshi Sagara,⁷ Teruo Nishida,⁷ Masaru Inatani,⁸ Hidenobu Tanibara,⁸ Makoto Aihara,⁹ Makoto Araie,⁹ Takeo Fukuchi,¹⁰ Haruki Abe,¹⁰ Tomomi Higashide,¹¹ Kazubisa Sugiyama,¹¹ Takashi Kanamoto,¹² Yoshiaki Kiuchi,¹² Aiko Iwase,¹³ Shigeaki Obno,¹⁴ Hidetoshi Inoko,¹⁵ and Nobubisa Mizuki¹

PURPOSE. Toll-like receptor 4 (TLR4) is a transmembrane receptor that mediates immune responses to exogenous and endogenous ligands and interacts with heat shock proteins, which are reportedly involved in normal tension glaucoma (NTG). This study was undertaken to investigate whether TLR4 polymorphisms are associated with NTG.

From the ¹Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Kanagawa, Japan; the ²Department of Legal Medicine, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Nagano, Japan; the ³Department of Ophthalmology, University of Yamanashi, Faculty of Medicine, Yamanashi, Japan; the ⁴Department of Ophthalmology, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, Japan; the ⁵Department of Surgery, Division of Ophthalmology, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan; the ⁶Department of Biomolecular Recognition and Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine, Yamaguchi, Japan; the ⁷Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan; the ⁸Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine, Tokyo, Japan; the ⁹Division of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata, Japan; the ¹⁰Department of Ophthalmology and Visual Science, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Kanazawa, Ishikawa, Japan; the ¹¹Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan; the ¹²Department of Ophthalmology, Tajimi Municipal Hospital, Tajimi, Gifu, Japan; the ¹³Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan; and the ¹⁴Department of Genetic Information, Division of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa, Japan.

¹⁵Contributed equally to the work and therefore should be considered equivalent authors.

Supported by grants-in-aid from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan; a grant from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan; and a grant from the Johnson & Johnson KK Vision Care Company (ES, AM, NM).

Submitted for publication December 12, 2007; revised May 17, and June 12 and 18, 2008; accepted August 25, 2008.

Disclosure: E. Shibuya, None; A. Meguro, None; M. Ota, None; K. Kasbiwagi, None; F. Mabuchi, None; H. Iijima, None; K. Kawase, None; T. Yamamoto, None; M. Nakamura, None; A. Negi, None; T. Sagara, None; T. Nishida, None; M. Inatani, None; H. Tanibara, None; M. Aihara, None; M. Araie, None; T. Fukuchi, None; H. Abe, None; T. Higashide, None; K. Sugiyama, None; T. Kanamoto, None; Y. Kiuchi, None; A. Iwase, None; S. Obno, None; H. Inoko, None; N. Mizuki, None.

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

Corresponding author: Akira Meguro, Department of Ophthalmology and Visual Science, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0004, Japan; akmeguro@yokohama-cu.ac.jp.

METHODS. Two hundred fifty Japanese patients with NTG and 318 Japanese healthy control subjects were recruited. Eight single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the TLR4 gene were genotyped, and allelic and phenotypic diversity was assessed between cases and control subjects.

RESULTS. Strong linkage disequilibrium was observed among all SNPs ($D' \geq 0.85$), which were located in one haplotype block. With respect to allelic diversity, the minor allele of three SNPs (rs10759930, rs1927914, and rs7037117) carried a significantly increased risk of NTG. With regard to genotypic diversity, individuals with the minor allele of six SNPs (rs10759930, rs1927914, rs1927911, rs12377632, rs2149356, and rs7037117) had a 1.47- to 1.65-fold increased risk of NTG. rs7037117, located in the 3'-untranslated region of TLR4, was most strongly associated with NTG, and when incorporated into a haplotype with rs10759930, the strongest association was detected ($P = 0.0038$, $P_c = 0.0095$).

CONCLUSIONS. Multiple SNPs in the TLR4 gene are associated with the risk of NTG. This finding suggests that the ligands and/or cytokines involved in the TLR4 signaling network may be risk factors for the development of NTG. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:4453-4457) DOI:10.1167/iov.07-1575

Glaucoma is a degenerative optic neuropathy characterized by the progressive loss of retinal ganglion cells and optic nerve axons, together with visual field damage; it often occurs in relation to elevated intraocular pressure (IOP). It is the second leading cause of blindness worldwide, affecting approximately 70 million people.^{1,2} Glaucoma is generally a multifactorial disorder initiated as the result of several interacting factors. Factors other than IOP are likely to play a role in the pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy, particularly in patients with normal tension glaucoma (NTG). NTG is an important subset of primary open-angle glaucoma (POAG). Although many POAG patients have high IOP,³ patients with NTG have statistically normal IOP.⁴⁻⁶ NTG accounts for approximately 20% to 50% of all POAG cases.⁷⁻⁹ In a recent study of the Japanese population, the reported prevalence of POAG was 3.9%, and 92% of patients with POAG had NTG, in which the IOP was 21 mm Hg or less.¹⁰ Because IOP is normal, NTG is underdiagnosed and usually presents late in life, after loss of the visual field. The factors contributing to the development of NTG have not yet been determined.

Recently, it has been suggested that the immune system and heat shock proteins (HSPs) play an important role in glaucoma.¹¹ HSPs are highly immunogenic molecules that are widely distributed in nature; they perform important functions relating to the folding and assembly of protein complexes. Human HSPs are expressed on cell membranes in response to stress, such as physiological shock and microbial challenge. Wax et al.¹² observed that patients with NTG have increased

serum immunoreactivity to bacterial and human HSP60. They also showed that direct application of antibodies to HSPs results in neuronal apoptosis, and patients with NTG have higher titers of antibodies to HSPs, including HSP27 and -60, compared with patients with high IOP and with healthy control subjects.^{13,14} Furthermore, they observed increased expression of HSP27 and -60 in the glaucomatous retina and/or optic nerve head and proposed that immunoregulation of these HSPs is an important component of glaucomatous optic neuropathy.¹⁵ Therefore, it may be important to investigate the HSPs and immune mechanisms involved in glaucoma, particularly NTG.

Toll-like receptor (TLR) proteins are a family of phylogenetically conserved receptors that recognize both self and nonself molecules and play an important role in both innate and adaptive immunity.^{16–18} Among the TLR family members, TLR4 has been most exhaustively investigated and is known to be a principal lipopolysaccharide (LPS)-recognition receptor; it also interacts with bacterial HSP60. TLR4 interacts with exogenous ligands as well as endogenous HSPs such as HSP60, -70, and -96.^{17,18} Recent studies report associations between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the TLR4 gene and endotoxin hyporesponsiveness^{19,20} and Gram-negative infections.²¹ TLR4 SNPs have also been demonstrated to affect the risk of various multifactorial disorders.^{22–28} These findings suggest that TLR4 gene sequence variants with abnormal function, such as abnormal recognition of HSPs or other ligands, may contribute to the development of various diseases, including multifactorial disorders.

Based on the ability of TLR4 to recognize self- and nonself HSPs, we hypothesized that TLR4 polymorphisms may be associated with the risk of NTG. To test this hypothesis, we performed SNP analysis of the TLR4 gene in patients with NTG and healthy control subjects.

MATERIALS AND METHODS

Participants

We recruited 250 unrelated Japanese patients with NTG and 318 unrelated healthy Japanese control subjects at Yokohama City University, Yamaguchi University, Gifu University, Kobe University, Yamaguchi University, Kumamoto University, Hokkaido University, Tokyo University, Niigata University, Kanazawa University, Hiroshima University, and Tajimi Municipal Hospital in Japan. NTG was diagnosed in the patients by the following strict inclusion criteria: the presence of glaucomatous optic neuropathy with corresponding visual field loss; normal open angle with angle width of Shaffer grade 2 or higher; absence of IOP greater than 21 mm Hg on repeat measurement with Goldmann applanation tonometry without medication; and lack of a pathologic basis for optic nerve change on neurologic, rhinologic, and general medical examination, including magnetic resonance imaging. Glaucomatous optic nerve abnormality was diagnosed when the vertical cup/disc ratio of the optic nerve head was 0.7 or higher, the rim width at the superior (11 to 1 o'clock) or inferior (5 to 7 o'clock) portion was less than or equal to 10% of the disc diameter, the difference in the vertical cup/disc ratio between eyes was 0.2 or greater, or a nerve fiber layer defect was found. Glaucomatous visual field loss was defined on a hemifield basis using reliable field data examined by a static visual field analyzer (HFA; Humphrey C-30-2 program; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany) according to Anderson and Patella's criteria.²⁹ The hemifield was judged abnormal when the pattern deviation probability plot showed a cluster of three or more non-edge contiguous points having sensitivity with a probability of less than 5% in the upper or lower hemifield and in one of these points with a probability of less than 1%.

In addition, the following inclusion and exclusion criteria were used to categorize the patient groups stringently. We excluded individuals in whom NTG was diagnosed at ≤ 20 years or ≥ 60 years, as

well as patients for whom the refractive error was the spherical equivalent of less than -8.0 D. To correct for the damaging effects of aging on the retinal ganglion (i.e., the mean deviation [MD] measured by HFA C-30-2) the selection criteria were modified based on subject age, as follows: (1) no modification if the patient was diagnosed below the age of 50 years, (2) -10.00 dB or worse in at least one eye if the disease was diagnosed when the patient was between the ages of 50 and 55 years, (3) -15.00 dB or worse in at least one eye if the disease was diagnosed when the patient was older than 55 years. Cases with a comparatively early onset were selected because early onset suggests stronger involvement of genetic factors. During diagnosis, patients whose refractions had changed, because of cataract surgery of refractive surgery, for example, were excluded. In cases in which glaucomatous visual field loss was present in only one eye, the refraction value and glaucomatous visual field loss of the affected eye were used. In cases in which glaucomatous visual field loss was present in both eyes, the refraction and glaucomatous visual field loss of the more severely affected eye were used.

Patient age ranged between 20 and 59 years (mean, 46.1 ± 7.7); 47.6% were men and 52.4% were women. The mean refraction was -4.02 ± 2.85 D, and the MD observed in the static visual field determination (Humphrey; Carl Zeiss Meditec) was -9.15 ± 7.67 dB.

Control subjects were healthy volunteers from a geographic region similar to that for the patients with NTG. They had no glaucoma or local or systemic illness that might cause glaucoma or optic disc changes, and they had no myopia or mild myopia with refractive errors of -3.00 D or less. The control subjects were sex matched (49.4% male and 50.6% female) to the patients, and their age range was 50 to 85 years (mean, 61.2 ± 8.3). The study was approved by the ethics committee of the Yokohama City University School of Medicine and complied with the guidelines of the Declaration of Helsinki. We explained study details to all patients and control subjects before obtaining consent for genetic screening.

DNA and TLR4 Genotyping

A kit (QIAamp DNA Blood Maxi Kit; Qiagen, Chatsworth, CA) was used to collect peripheral blood lymphocytes and extract genomic DNA from peripheral blood cells. Procedures were performed under standardized conditions to prevent variation in DNA quality.

TLR4 comprises four exons and has four transcript isoforms (A, B, C, and D). We evaluated eight SNPs: rs10759930, rs1927914, rs1927911, rs12377632, rs2149356, rs11536889, rs7037117, and rs7045953. These SNPs are located within the TLR4 gene, including 5 kb of the predicted 5' untranslated region (UTR) and 6 kb of the predicted 3' UTR, with minor allele frequencies $>5\%$ according to the National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD) dbSNP (Table 1). Genotyping of all SNPs was performed by a 5' exonuclease assay (TaqMan; Applied Biosystems, Inc., [ABI] Foster City, CA) using primers supplied by the manufacturer. The probe fluorescence signal was detected (TaqMan Assay for Real-Time PCR, 7500 Real Time PCR System; ABI), according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

We tested the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) of each SNP among the control subjects. Differences in allele and genotype frequencies between cases and control subjects were assessed by using the χ^2 test. The program Haploview 3.32 was used to compute pair-wise linkage disequilibrium (LD) statistics.³⁰ D' and r^2 were plotted. LD blocks were defined according to the criteria of Gabriel et al.³¹ Haplotype frequencies were estimated using an accelerated expectation-maximization algorithm similar to the partition-ligation-expectation-maximization method.³² Statistical significance was defined as $P < 0.05$. To obtain a measure of significance corrected for multiple testing bias we ran 10,000 permutations to compute P with the Haploview program.

Tag SNP Selection

To avoid overfitting and unbounded haplotype tests in the association analysis, the Tagger algorithm in Haploview 3.32 was used to select the

TABLE 1. Allele Frequencies of SNPs of the TLR4 Gene among NTG Patients and Control Subjects

dbSNP	Alleles (1/2)	Position (bp)	Gene Location	Minor Allele Frequency, n (%)		P	P _c	95% CI
				Cases (n = 250)	Controls (n = 318)			
rs10759930	T/C	119,501,442	5'-UTR	211 (42.2)	221 (34.7)	0.010	0.038	1.37 (1.08-1.74)
rs1927914	A/G	119,504,546	5'-UTR	210 (42.0)	221 (34.7)	0.012	0.048	1.36 (1.07-1.73)
rs1927911	G/A	119,509,875	Intron	204 (40.8)	219 (34.4)	0.028	0.099	1.31 (1.03-1.67)
rs12377632	C/T	119,512,551	Intron	206 (41.2)	218 (34.3)	0.017	0.062	1.34 (1.05-1.71)
rs2149356	G/T	119,514,020	Intron	204 (40.8)	218 (34.3)	0.024	0.091	1.32 (1.04-1.68)
rs11536889	G/C	119,517,952	3'-UTR	116 (23.2)	163 (25.6)	0.35		
rs7037117	A/G	119,523,484	3'-UTR	126 (25.2)	116 (18.2)	0.0044	0.018	1.51 (1.14-2.01)
rs7045953	A/G	119,525,616	3'-UTR	49 (9.8)	49 (7.8)	0.21		

Position is distance from short arm telomere. P calculated by χ^2 test 2×2 contingency table. We corrected these probabilities (P_c) for multiple testing by Haploview program using 10,000 permutations. 1, major allele; 2, minor allele; bp, base pairs; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

tag SNPs that optimally capture common haplotypes within the TLR4 gene. The algorithm is based on r^2 , and application of a stringent r^2 threshold ($r^2 > 0.8$) between SNPs would allow the selected tag SNPs to resolve more than 80% of all existing haplotypes.³⁵

RESULTS

HWE Tests and Haplotype Block

Eight SNPs in the TLR4 gene were genotyped. All SNPs were in HWE among both cases and control subjects (data not shown). All eight SNPs were located in 1 haplotype block, and the magnitude of LD between each SNP was extremely high, with pair-wise $D' \geq 0.85$ (Fig. 1).

Allele and Genotype Frequencies

Table 1 shows details of 8 SNPs, their genomic locations, and minor allele frequencies in cases and control subjects. The frequencies of the minor alleles of all SNPs but rs11536889

were increased in cases compared with healthy control subjects, and three SNPs (rs10759930, rs1927914, and rs7037117) revealed significant allelic association between cases and control subjects ($P_c < 0.05$). Among these, the minor allele of rs7037117, located in the 3'-UTR of TLR4, had the most significantly increased risk of NTG ($P = 0.0044$, $P_c = 0.018$, OR = 1.51, 95% CI = 1.14-2.01). Genotype frequencies of eight SNPs are shown in Table 2. Individuals carrying one or two copies of the minor allele of six SNPs (rs10759930, rs1927914, rs1927911, rs12377632, rs2149356, and rs7037117) had a 1.47- to 1.65-fold increased risk of NTG, with individuals bearing the minor allele of rs7037117 having the most significantly increased risk over that of control subjects ($P = 0.0041$).

Tag SNPs Selection and Haplotype Analysis

To estimate haplotype frequencies and to analyze the haplotype association with NTG, we selected tag SNPs using the Tagger algorithm in the program Haploview to select a comparatively nonredundant set of SNPs. Four tag SNPs, including rs10759930, rs11536889, rs7037117, and rs7045953, were selected that captured most of the allelic diversity of the 8 TLR4 SNPs. As shown in Table 3, Haplotype CGGA, which included minor alleles of rs10759930 and rs7037117 and major alleles of rs11536889 and rs7045953, was significantly associated with an increased risk of NTG ($P = 0.0090$, $P_c = 0.041$, OR = 1.59, 95% CI = 1.12-2.28), although the overall comparison of haplotypes consisting of four tag SNPs rendered a slightly significant difference between cases and control subjects ($P = 0.044$). On the other hand, the overall comparison of haplotypes created by two tag SNPs, rs10759930 and rs7037117, associated with NTG was significantly different between cases and control subjects ($P = 0.010$), with one of the haplotypes showing an increased risk for NTG (Haplotype CG: $P = 0.0038$, $P_c = 0.0095$, OR = 1.53, 95% CI = 1.15-2.03). These results suggest that only Haplotype CG created by minor alleles of rs10759930 and rs7037117 was a susceptibility haplotype and the significant increase of minor alleles of rs10759930, rs1927914, rs1927911, rs12377632, and rs2149356 in patients with NTG may arise from a strong linkage disequilibrium with rs7037117.

DISCUSSION

The purpose of this study was to investigate whether TLR4 polymorphisms affect the development of NTG, which is considered a multifactorial disorder. To our knowledge, this is the first attempt to investigate a series of common SNPs located in the TLR4 gene. We demonstrated that multiple SNPs in the

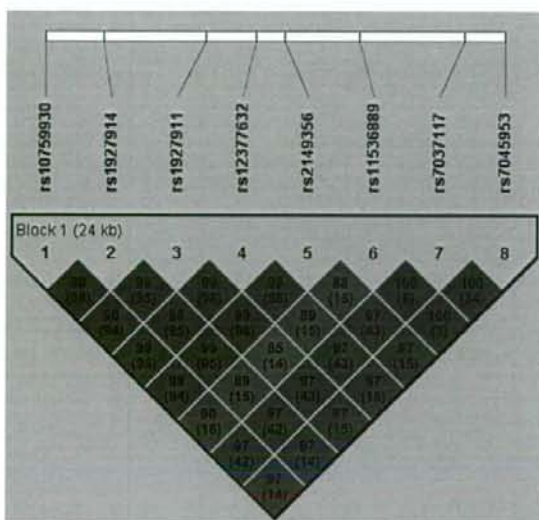


FIGURE 1. Linkage disequilibrium plot of eight SNPs of the TLR4 gene in 568 study subjects. D' and r^2 (in parentheses) corresponding to each SNP pair are expressed as a percentage and shown within the respective square. Higher D' is indicated by a brighter red. The eight SNPs constitute a haplotype block spanning 24 kb of the TLR4 gene.

TABLE 2. Genotype Frequencies of SNPs of the TLR4 Gene among NTG Patients and Control Subjects

dbSNP	Alleles (1/2)		Genotype Frequency, n (%)				Minor Allele Dominance (1/2+2/2)	
			1/1	1/2	2/2	P	P	OR (95%CI)
rs10759930	T/C	Cases	81 (32.4)	127 (50.8)	42 (16.8)	0.028	0.0094	1.58 (1.12-2.23)
		Controls	137 (43.1)	141 (44.3)	40 (12.6)			
rs1927914	A/G	Cases	82 (32.8)	126 (50.4)	42 (16.8)	0.036	0.012	1.55 (1.10-2.19)
		Controls	137 (43.1)	141 (44.3)	40 (12.6)			
rs1927911	G/A	Cases	87 (34.8)	122 (48.8)	41 (16.4)	0.067	0.021	1.49 (1.06-2.10)
		Controls	141 (44.3)	135 (42.5)	42 (13.2)			
rs12377632	C/T	Cases	86 (34.4)	122 (48.8)	42 (16.8)	0.053	0.020	1.50 (1.07-2.11)
		Controls	140 (44.0)	138 (43.4)	40 (12.6)			
rs2149356	G/T	Cases	87 (34.8)	122 (48.8)	41 (16.4)	0.070	0.026	1.47 (1.05-2.07)
		Controls	140 (44.0)	138 (43.4)	40 (12.6)			
rs11536889	G/C	Cases	146 (58.4)	93 (37.2)	11 (4.4)	0.42	0.51	
		Controls	177 (55.6)	119 (37.4)	22 (6.9)			
rs7037117	A/G	Cases	138 (55.2)	98 (39.2)	14 (5.6)	0.015	0.0041	1.65 (1.17-2.32)
		Controls	213 (67.0)	94 (29.6)	11 (3.5)			
rs7045953	A/G	Cases	203 (81.2)	45 (18.0)	2 (0.8)	0.19	0.28	
		Controls	269 (84.6)	49 (15.4)	0 (0.0)			

Patients $n = 250$ and controls $n = 318$. P was calculated by χ^2 test 3×2 or 2×2 contingency table. 1, major allele; 2, minor allele.

TLR4 gene significantly affect the development of NTG and that increased frequency of the minor allele of these SNPs, minor TLR4 polymorphism, increases the risk of NTG. rs7037117 had the most pronounced effect on the development of NTG, and haplotype CG, created by minor alleles of rs10759930 and rs7037117, conferred a significantly increased risk of NTG. LD analysis showed that the eight SNPs were in high LD and located in one haplotype block. These results suggest that rs7037117 is principally associated with risk of NTG and that strong LD with rs7037117 is responsible for the increased frequency of the minor allele of other SNPs in patients with NTG.

rs7037117 is located in the 3' UTR of the TLR4 gene. Since the sequence and structural motifs of the 3' UTR are known to participate in the regulation of mRNA stability, translation, and localization, it is possible that the 3' UTR sequence regulates the expression of the TLR4 gene and that rs7037117 may play a critical role in the gene expression process. Recently, we found that Behçet's disease, is probably triggered by HSPs or LPS and is significantly associated with rs7037117.³⁴

Among the various ligands of TLR4, HSPs have been reported to be associated with the development of NTG.¹²⁻¹⁵

The main function of TLRs is the induction of various inflammatory cytokines and effector molecules; TLR4 is known to recognize antigens such as HSPs and LPS and to induce the production of many cytokines, including interleukin (IL)-1, IL-6, IL-10, IL-13, tumor necrosis factor- α , and interferon- β .¹⁸ Yoneda et al.³⁵ reported that IL-1 β levels in the rat retina are increased after retinal ischemia and reperfusion; they proposed that IL-1 is an important mediator of ischemic and excitotoxic retinal damage in glaucoma. Several recent studies investigating the association between the IL-1 gene and NTG or high tension glaucoma (HTG) have shown no significant association between NTG or HTG and IL-1 α or IL-1 β ,³⁶⁻³⁸ although one study demonstrated a significant association between the IL-1 α polymorphism and HTG.³⁹ Thus, the increased IL-1 in the ischemic retina may be due to a sequence variant of the inducer gene, such as TLR4, that is involved in the expression of IL-1 rather than to an IL-1 gene polymorphism itself. In addition, Baudouin et al.⁴⁰ showed that IL-6 and IL-10 are overexpressed in patients with glaucoma. Thus, a TLR4 signaling network comprising HSPs and IL may play a significant role in the development of NTG.

TABLE 3. Haplotype Frequencies of Tag SNPs of the TLR4 Gene among NTG Patients and Control Subjects

Haplotype	Frequency, %		P	P_c	OR (95% CI)	Overall P
	Cases (n = 250)	Controls (n = 318)				
Tag SNPs rs10759930, rs11536889, rs7037117 and rs7045953						0.044
TGAA	35.0	40.2	0.070			
TCAA	22.6	24.7	0.41			
CGAA	16.6	15.9	0.75			
CGGA	15.4	10.2	0.0090	0.041	1.59 (1.12-2.28)	
CGGG	9.6	7.7	0.26			
Tag SNPs rs10759930 and rs7037117						0.010
TA	57.5	64.9	0.011	0.027	0.73 (0.58-0.93)	
CG	24.9	17.9	0.0038	0.0095	1.53 (1.15-2.03)	
CA	17.3	16.9	0.86			

Haplotypes with frequency less than 1% are not listed. P values were calculated by χ^2 test 2×2 contingency table. These probabilities (P_c) for multiple testing were corrected by Haploview program using 10,000 permutations. Overall P was calculated by χ^2 test 5×2 or 3×2 contingency table.

In conclusion, we found that multiple SNPs within the high-LD region of the TLR4 gene are associated with the risk of NTG. We also determined that 1 SNP in the 3' UTR of the TLR4 gene is principally associated with NTG. Our findings suggest that TLR4 ligands such as HSPs and cytokines induced by TLR4 (e.g., IL-1) play an important role in NTG. Therefore, it is imperative to identify the ligands associated with the TLR4 sequence variant and the TLR4 signaling network that affects the development of NTG.

References

- Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol*. 1996;80(5):389-393.
- Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006;90(3):262-267.
- Quigley HA. Open-angle glaucoma. *N Engl J Med*. 1993;328(15):1097-1106.
- Hitchings RA, Anderson SA. A comparative study of visual field defects seen in patients with low-tension glaucoma and chronic simple glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 1983;67(12):818-821.
- Hitchings RA. Low-tension glaucoma: its place in modern glaucoma practice. *Br J Ophthalmol*. 1992;76(8):494-496.
- Werner EB. Normal-tension glaucoma. In: Ritch R, Shields MB, Krupin T, eds. *The Glaucomas*. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1996:769-797.
- Shinose Y, Kitazawa Y, Tsukahara S, et al. Epidemiology of glaucoma in Japan—a nationwide glaucoma survey. *Jpn J Ophthalmol*. 1991;35(2):133-135.
- Klein BE, Klein R, Sponsel WE, et al. Prevalence of glaucoma. The Beaver Dam Eye Study. *Optometry*. 1992;99(10):1499-1504.
- Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, et al. Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population. The Egna-Neumarkt Study. *Optometry*. 1998;105(2):209-215.
- Iwase A, Suzuki Y, Araie M, et al. Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Optometry*. 2004;111(9):1641-1648.
- Tezel G, Yang J, Wax MB. Heat shock proteins, immunity and glaucoma. *Brain Res Bull*. 2004;62(6):473-480.
- Wax MB, Tezel G, Saito I, et al. Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1998;125(2):145-157.
- Tezel G, Seigel GM, Wax MB. Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(12):2277-2287.
- Wax MB, Tezel G, Kawase K, Kitazawa Y. Serum autoantibodies to heat shock proteins in glaucoma patients from Japan and the United States. *Optometry*. 2001;108(2):296-302.
- Tezel G, Hernandez R, Wax MB. Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(4):511-518.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675-680.
- Andreaskos E, Foxwell B, Feldmann M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunol Rev*. 2004;202:250-265.
- Kang SSW, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors: Applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(6):951-983.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000;25(2):187-191.
- Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem*. 2002;48(10):1661-1667.
- Agnese DM, Calvano JE, Hahn SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis*. 2002;186(10):1522-1525.
- Keichl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002;347(3):185-192.
- Franchimont D, Vermeire S, Housni HEI, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 2004;53(7):987-992.
- Ouburg S, Mallant-Hent R, van Bodegraven AA, et al. The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299gly polymorphism is associated with colonic localization of Crohn's disease without a major role for the Saccharomyces cerevisiae mannan-LBP-CD14-TLR4 pathway. *Gut*. 2005;54(3):439-440.
- Radstake TRDJ, Franke B, Hanssen S, et al. The toll-like receptor 4 Asp299gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum*. 2004;50(3):999-1001.
- Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang BL, et al. Sequence variants of Toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the Cancer Prostate in Sweden study. *Cancer Res*. 2004;64(8):2918-2922.
- Chen YC, Giovannucci E, Lazarus R, Kraft P, Ketkar S, Hunter DJ. Sequence variants of Toll-like receptor 4 and susceptibility to prostate cancer. *Cancer Res*. 2005;65(24):11771-11778.
- Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, et al. Association of the toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12):e61-e64.
- Anderson DR, Patella VM. *Automated Static Perimetry*. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1999:121-190.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-265.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296(5576):2225-2229.
- Qin Z, Niu T, Liu J. Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2002;71(5):1242-1247.
- Chapman JM, Cooper JD, Todd JA, Clayton DG. Detecting disease associations due to linkage disequilibrium using haplotype tags: a class of tests and the determinants of statistical power. *Hum Hered*. 2003;56:18-31.
- Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, et al. Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:725-727.
- Yoneda S, Tanihara H, Kido N, et al. Interleukin-1 β mediates ischemic injury in the rat retina. *Exp Eye Res*. 2001;73(5):661-667.
- Wang CY, Shen YC, Lo FY, et al. Normal tension glaucoma is not associated with the interleukin-1 α (-889) genetic polymorphism. *J Glaucoma*. 2007;16(2):230-233.
- Wang CY, Shen YC, Su CH, et al. Investigation of the association between interleukin-1 β polymorphism and normal tension glaucoma. *Mol Vis*. 2007;13:719-723.
- How ACS, Aung T, Chew X, et al. Lack of association between interleukin-1 gene cluster polymorphisms and glaucoma in Chinese subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(5):2123-2126.
- Wang CY, Shen YC, Su CH, et al. Polymorphism in the IL-1 α (-889) locus associated with elevated risk of primary open angle glaucoma. *Mol Vis*. 2006;12:1380-1385.
- Baudouin C, Hamard P, Liang H, Creuzot-Garçon C, Bensoussan I, Brignole F. Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Optometry*. 2004;111(12):2186-2192.



Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma

M Akiyama, K Yatsu, M Ota, Y Katsuyama, K Kashiwagi, F Mabuchi, H Iijima, K Kawase, T Yamamoto, M Nakamura, A Negi, T Sagara, N Kumagai, T Nishida, M Inatani, H Tanihara, S Ohno, H Inoko and N Mizuki

Br. J. Ophthalmol. 2008;92:1293-1296
doi:10.1136/bjo.2008.139980

Updated information and services can be found at:
<http://bjo.bmj.com/cgi/content/full/92/9/1293>

These include:

Data supplement

"web only table"
<http://bjo.bmj.com/cgi/content/full/92/9/1293/DC1>

References

This article cites 22 articles, 7 of which can be accessed free at:
<http://bjo.bmj.com/cgi/content/full/92/9/1293#BIBL>

Rapid responses

You can respond to this article at:
<http://bjo.bmj.com/cgi/eletter-submit/92/9/1293>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article

Notes

To order reprints of this article go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *British Journal of Ophthalmology* go to:
<http://journals.bmj.com/subscriptions/>