

200834001A

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

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

平成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難治性疾患克服研究事業

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

平成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>

黄斑変性カニクイザルを用いた補体活性抑制剤による加齢黄斑変性の

予防・治療法の確立と情報収集システムの開発

班員名簿（平成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 寺尾 恵治 吉川 泰弘 溝田 淳 西村 俊秀 松野 聖 村上 晶 安川 力	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター 東京大学大学院農学生命科学研究科 順天堂大学医学部浦安病院眼科 東京医科大学臨床プロテオームセンター 参天製薬（株）開発研究センター 順天堂大学医学部眼科 名古屋市立大学大学院医科学研究所	教授 センター長 教授 准教授 客員教授 チームリーダー 教授 准教授
事務局	涌井 笑子	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター（感覚器センター） 細胞・分子生物学研究室 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL/FAX (03)3411-1026	秘書
経理事務担当	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

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

岩田 岳	国立病院機構東京医療センター臨床研究センター
三宅 養三	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻
寺尾 恵治	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター
吉川 泰弘	東京大学大学院農学生命科学研究科
溝田 淳	順天堂大学医学部浦安病院眼科
村上 晶	順天堂大学医学部眼科
安川 力	名古屋市立大学大学院医科学研究所
松野 聖	参天製薬(株)開発研究センター

II. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

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

総括研究報告書

主任研究者	岩田 岳	東京医療センター臨床研究センター	部長
分担研究者	三宅 養三	愛知淑徳大学医学福祉部	教授
分担研究者	寺尾 恵治	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター	特別研究員
分担研究者	吉川 泰弘	東京大学大学院農学生命科学研究科	教授
分担研究者	溝田 淳	順天堂大学浦安病院眼科	助教授
分担研究者	松野 聖	参天製薬（株）開発研究センター	チームリーダー
分担研究者	村上 晶	順天堂大学医学部眼科	教授
分担研究者	安川 力	名古屋市立大学大学院医科学研究所	准教授

研究要旨：加齢黄斑変性の早期発見を目的として、加齢黄斑変性の感受性遺伝子の探索を行い、これを複数発見した（特許出願）。また、加齢黄斑変性の血漿成分を分析し、血中に疾患特有の成分を発見した（特許出願）。さらに、予防・治療を目的として、霊長類医科学研究センターの若年性（遺伝性）の黄斑変性カニクイザルを用いて補体C3b活性化抑制薬 Compstatin による薬効試験を行い、投与6ヶ月後の眼底観察ではドルーゼンが顕著に消失していることが明らかになった。ドルーゼンが意図的な操作で消失した世界で初めての例となった。

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

1. 研究目的

黄斑は角膜と水晶体によって収束した光が網膜上で結像する領域で、光を感じる視細胞が最も密に集中する。ここは視力を決定する重要な部位であり、障害されると著しい視力低下、ひいては失明に至る。代表的な疾患として難治性加齢疾患の加齢黄斑変性がある。加齢黄斑変性は網膜色素上皮細胞とブルッフ膜との間に蓄積するドルーゼンを特徴とし、網膜色素上皮細胞から周辺網膜への萎縮と進行する萎縮型加齢黄斑変性と脈絡膜から網膜色素上皮細胞へ向かって血管新生をともなう滲出型加齢黄斑変性に分類される。米国では65歳以上で失明率が最も高い眼疾患であるが、日本でも急速な高齢化、生活の欧米化そして診断技術の進歩によって患者数は急増しており、その原因解明と根本的な予防・治療法の開発が求められている。

黄斑は高解像度の視力を獲得した霊長類や一部の鳥類でのみ発達しており、通常の実験に使用されるマウス、ラット、モルモットなどの夜行性ゲツ歯類には存在しない。根本的な予防・治療法の開発が進まない理由の1つとして、黄斑を持つ疾患動物が存在しなかったことが原因として挙げられる。このような状況の中、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで発見された黄斑変性カニクイザルは生後2年でドルーゼンを発症する世界で唯一の霊長類モデルとして注目されている。ドルーゼンは加齢黄斑変性の特徴として、ヒトでは50歳以上で蓄積が観察されている。三宅等によって開発された、局所ERG（網膜電図）測定装置を用いてドルーゼンの蓄積量が多い疾患個体について測定したところ、黄斑部における光に対する反応が著しく低下していることが明らかとなり、この疾

患サルは萎縮型加齢黄斑変性動物モデルのモデルであることが明らかとなった。

我々はドルーゼンの組成に補体活性因子が存在することから補体活性経路が合流するC3補体因子の抑制によってドルーゼンの蓄積を抑制し、加齢黄斑変性の予防法として利用できるか疾患サルを用いて薬効試験を行った。

加齢黄斑変性は遺伝、習慣、環境などの因子によって発症する多因子疾患と考えられており、サルの研究と並行してヒトの遺伝要因である感受性遺伝子の探索を行った。倫理委員会の承認と患者の同意を得て採血し、DNA 200検体（コントロールは200検体）と血漿150検体（コントロールは150検体）が収集された。感受性遺伝子の探索には50万種類の遺伝子多型チップを用い、血漿プロテオーム解析には低分子血漿タンパク質分画装置とイオンとラップ型質量分析計によって低分子量血漿成分について探索を行った。

本研究事業は加齢黄斑変性の原因解明と予防法の開発を目的として1)世界で唯一の若年性黄斑変性カニクイザルの病理学的解析、2)疾患サルを用いた補体抑制による予防法の開発、また、3)ヒト加齢黄斑変性のバイオマーカーの探索を目的として感受性遺伝子の探索と機能解析、4)血漿プロテオーム解析を行った。

2. 研究方法

1)黄斑変性カニクイザルの病理学的、分子細胞生物学的解析：我々はこれまで独立行政法人国立医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで発見された世界で唯一の遺伝性でドルーゼンを発症する若年性黄斑変性カニクイザルの病理学的及び分子生物学的解析を行ってきた。ヒト加齢黄斑変性の初期（50歳前後）に観察される網膜下に蓄積するドルーゼンが生後2年で観察される。我々はドルーゼンの組成に補体活性因子が含まれていることを発見した(Umeda, Iwata et al, IOVS 2005, Umeda, Iwata et al, FASEB J 2005)。補体活性化のメカニズムを解明するために、重症疾患個体、軽症疾患個体、正常個体から網膜色素上皮細胞を分離培養し、細胞の形態観察や遺伝子発現解析を行った。

2)補体抑制による加齢黄斑変性の予防法の開発：最近の研究によって補体活性化による網膜下の局所的な炎症反応が加齢黄斑変性の原因として考えられることから、C3補体抑制剤による予防法の開発を試みた。補体抑制薬と

してC3補体因子の活性を抑制する

Compstatin (Lambris et al, J. Immunol. 2000)の改良型POT-4について50マイクログラムの硝子体投与を毎週12ヶ月行った。黄斑部は月単位で観察され、撮影されたドルーゼンの画像についてその形状や数について解析し、薬効評価を行った。

(3)加齢黄斑変性バイオマーカーの探索：

主に国立病院機構、順天堂大学からDNA 250検体が集められた。このうち200検体とコントロール（加齢性白内障）の200検体についてAffymetrix GeneChip Human Mapping 50K Array Setを用いて50万種類の遺伝子多型が解析され、全ゲノム相関解析（Genome Wide Association Study）を行った。また広義の加齢黄斑変性に含まれるポリープ状脈絡膜血管症（PCV）についてもDNA 200検体の集め、同様な方法で解析を行った。患者群および健常者群から得られたSNPジェノタイプング結果について、それぞれのSNPごとのCall Rateが90%以上、全体のMinor Allele Frequencyが5%以上、健常者群のHardy-Weinberg平衡検定が0.0001以上のSNPを解析対象とする。上記解析対象SNPについて、アリル頻度、ジェノタイプ頻度、優性モデル、劣性モデルでのカイニ乗検定、トレンド検定を用いた関連解析を行った。Bonferroniの補正p値もしくはBenjamini & Hochbergらの方法によるFalse Discovery Rateを用いて、緑内障と強い相関があると認められたSNPの近傍に位置し、なおかつJPT+CHBのアリル頻度情報からMAFが5%以上のSNPについてTaqmanプローブ法を用いて高密度タイピングをおこない疾患と関連する領域を決定した。

(4)加齢黄斑変性の血漿バイオマーカーの探索：遺伝子多型解析と並行して、血漿タンパク質成分の変化によって疾患の早期発見が可能か、検討を行った。主に、国立病院機構、順天堂大学、ブラサッド眼研究所（インド）によって加齢黄斑変性患者の血漿150検体を集め、比較対象として白内障患者の血漿150検体が集められた。血漿中には22種類のタンパク質が99%を占めるために、まずはこれらを除くために、東レ株式会社、参天製薬株式会社との共同研究によって開発された低分子量蛋白分画装置を使って低分子の血漿タンパク質を分画し、逆相クロマトグラフィー、トリプシン処理、2次元クロマトグラ

フィーを経て、イオントラップ型質量分析計によるプロテオーム解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者検体の遺伝子解析やプロテオーム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血液検体を収集した。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した。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」の承認を得て実行された。

3. 研究結果及び考察

1) 黄斑変性カニクイザルの病理学的、分子細胞生物学的解析：疾患カニクイザルのドルーゼンについて継続的な観測を行った結果、早い個体では1歳後半から黄斑を中心にドルーゼンが現れ、生後2-5歳の間に急激にその数が増加する。黄斑部の局所ERGを測定した結果、黄斑を中心として5°、10°、15°の範囲で光に対する網膜の反応が消失していることが明らかになった。この結果、疾患サルは萎縮型黄斑変性を発症しており、ヒトの20倍の進行速度でドルーゼンが蓄積し、視機能が障害されることが確認された。

(2) 疾患個体から分離培養された網膜色素上皮細胞のマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析及びプロテオーム解析による蛋白発現解析：網膜色素上皮細胞は神経網膜と脈絡膜層を分離する重要なバリアの役目を果たしており、視細胞外節のどん食作用や各種成長因子の放出など、網膜の恒常性維持には不可欠である。この細胞の機能低下によってドルーゼンの蓄積が起こると予測されている。今回我々は重症、軽症、健常個体の網膜色素上皮細胞(RPE細胞)を分離培養し、その増殖やタイトジャンクションタンパク質について観察した結果、重症個体のRPE細胞は他個体に比較して増殖能が顕著に低下していることが明らかになった。また、タイトジャンクションタンパク質のZO-1の発現が健常RPE細胞と比較して重症個体では細胞周辺に局在が観察されず、バリア機能が破綻していることが明

らかにされた。ドルーゼンが早期に蓄積する根拠となる。また、これらのRPE細胞について、カニクイザル専用の遺伝子発現解析用DNAマイクロアレイを用いて発現遺伝子の比較を行った結果、MHC1遺伝子ファミリーに20-30倍の差で発現が上下していることが明らかになった。MHC1遺伝子は獲得免疫に関与するだけでなく、細胞の貪食作用にも関与しており、これら一連の機能が破綻していることによって、早期ドルーゼンの蓄積から視機能低下へと進行すると考えられる。世界的には萎縮型加齢黄斑変性の患者数が最も多いことから、本研究事業によって得られた情報の応用が期待される。

3) 補体抑制薬による動物実験：補体抑制薬として補体因子C3の活性を抑制する

Compstatinの改良型POT-4について50μgを1週間単位で、1mgを1ヶ月単位で硝子投与した。その結果、1mg投与の個体については薬の残存量が多く、眼底観察に支障をきたしたので、投与量を50μgに変更した。投与量の50μgは想定される必要抑制量の3倍量を必要投与間隔である3週間に1週間に縮めて投与しており、十分な抑制効果が得られたと思われる。疾患個体8頭について1年間の投与期間を経過し、眼底観察による黄斑部でのドルーゼンの形態や数を比較した結果、投与から6ヶ月経過した時点からドルーゼンが拡散し、一部のドルーゼンが消失していることが明らかになった。ドルーゼンが人工的な手法によって拡散、消失した例は今回が世界で初めてである。拡散や消失したドルーゼンのより詳細な情報を得るために、疾患個体と安楽死させて、網膜切片の観察や免疫染色法によって、ドルーゼン中の補体活性分子などを解析している。同じPOT-4は加齢黄斑変性の予防薬としてアメリカで第1相試験を通過し、第2相が準備されている。

(4) 若年性加齢黄斑変性カニクイザルの原因遺伝子の解明：2006年に発表されたマカカ属の連鎖解析マーカーを用いて生存する個体から抽出されたDNA検体についてフラグメント解析に続き、連鎖解析が行われた。また、2007年にはマカカ属のアカゲザルのゲノム配列が論文として報告され、その後徐々にアノテーションが終了した遺伝子配列、遺伝子多型、新たな連鎖解析マーカーがデータベース上で整備されてきた。これらの情報を利用して染色体4q領域(ヒト6q)

をさらに詳しく解析した結果、ヒトの6q27領域に相当するサル連鎖解析マーカーと強く相関することが明らかになった。この領域はMHC Iや補体関連分子がクラスターを形成して存在する場所であり、遺伝子解析とRPE細胞の解析によって加齢黄斑変性における獲得免疫と自然免疫の関与を強く示唆する結果となった。

(5) 加齢黄斑変性リスク遺伝子の探索：国立病院機構の付属病院と順天堂大学医学部浦安病院眼科を中心として滲出型加齢黄斑変性のDNA250検体が集められた。このうち200のDNA検体とコントロールとなる加齢性白内障対象200DNA検体についてAffymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array Setを用いて全ゲノム相関解析を行った。その結果、染色体1番-22番の中でボンフェローニ補正をクリアした3つのSNPが p 値 10^{-14} の確からしきで検出された。これらのSNPは全て染色体10番の同じローカスに存在し、仮想遺伝子のLOC387715とHTRA1遺伝子が存在する。LOC387715はウエスタンブロットによって内在タンパク質が確認されておらず、non-coding RNAとしての機能について解析中である。HTRA1についてはノックアウトマウスを作製したが、生後12ヶ月でも網膜の異常が観察されなかった。そこでHTRA1を高発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、脈絡膜層が薄くなり、一部RPE細胞の萎縮が観察され、滲出型加齢黄斑変性を発症する土台が作られたと考えられる。このマウスはきわめて衛生的な環境で適正な食事で飼育されており、強い青色光(環境因子)や喫煙(習慣因子)を加えることによって加齢黄斑変性に類似する異常を発症できる可能性がある。米国での同様な解析では染色体10番に加え、1番の補対H因子も相関するが、この領域については日本人の滲出型加齢黄斑変性は相関していない。欧米に比較して日本での加齢黄斑変性の患者数が少ないことや、滲出型の加齢黄斑変性が多いことはこれまで謎であったが、本研究によって遺伝的な回答が得られたと考えられる。これらの情報は早期診断法の確立だけでなく、発症機序の解明にもきわめて重要な発見であり、特許も出願された。

(6) 加齢黄斑変性血漿バイオマーカーの探索：血漿成分によって疾患の早期発見が可能な検討した。東レ株式会社及び参天製薬株式

会社と共同開発した低分子量蛋白分画装置を用いてアルブミンやグロブリンなどの主蛋白が除かれ、その残りの分画について逆相クロマトグラフィーを行った結果、加齢黄斑変性と白内障のクロマトグラムには大きな違いが観察された。これからフラクションについてトリプシン処理を行い、2次元クロマトグラフィーでさらに分画した後にイオントラップ型質量分析計によってプロテオーム解析が行われた。この結果、ユビキチンを含む複数のタンパク質が患者血漿で優位に検出された。これらのタンパク質は加齢黄斑変性の生体内で特異的にユビキチン化され、分解されて血漿中に漏出されると予測され、早期診断マーカーとして利用に加えて、発症機序との関係で分解機構について研究中である。これらの結果は特許として出願された。

(7) 予防・治療法の条件設定を支援するための支援情報システムの構築：症例情報に加え、患者遺伝子情報、患者血漿蛋白情報をデータベース化し、検索できるシステムを構築中である。

4. 評価

1) 達成度について：本研究は霊長類医学研究センターの加齢黄斑変性カニクイザルの病理学的、分子細胞生物学的解析と補体抑制による加齢黄斑変性の予防法の開発を中心にヒト加齢黄斑変性の感受性遺伝子の解明や機能解析による萎縮型と滲出型の違いについて研究を行った。当初予定されていた研究内容については全て実行あるいは実行準備に着手したが、一部の実験については必要性の低下、あるいは研究期間内の実行が難しくなった。本研究によって加齢黄斑変性の基礎的情報から創薬について多くのことが明らかになり、引き続きこの研究を継続する予定である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：本研究の解析対象である黄斑変性カニクイザルは国内外の多数の研究者に注目されている。その原因として、生後2年でドルーゼンが観察され、ドルーゼンが過度に蓄積することによって黄斑の視機能が顕著に低下するような霊長類モデルが世界的に存在しないからである。優性遺伝によって疾患サルから生まれる半数が疾患個体であり、その確認に2年間しか要しないことから多数の疾患個体が確保されている。これまでに国内外の複数の企業から加齢黄斑変性の予防薬につい

て薬効試験の依頼が寄せられている。

本研究が実施されている期間中に米国を中心に10社ほどが他の病気で開発された補体抑制薬を加齢黄斑変性に転用することを発表しており、2008年のアメリカ眼科アカデミーでも可能性が示された。しかし、多くの会社は補体活性経路（古典経路、2次経路、レクチン経路）の始点をターゲットにしており、2社のみがC3、C5をターゲットにしている。本研究は世界に先駆けて補体抑制の効果を示すことができた。

また、疫学調査が進んでいる先進国において、日本人に占める加齢黄斑変性の有病率や種類が異なっていることがこれまで指摘されてきたが、その理由に遺伝的な特徴が存在することを発見できたことは、日本人に適した今後の予防・治療法の開発に方向性を示すことができたと考えられる。中国、韓国、台湾などでの同様な解析が注目される。

3) 今後の展望について：黄斑変性カニクイザルの連鎖解析やRPE細胞の遺伝子、プロテオーム解析から獲得免疫と自然免疫の双方が疾患の発症と強く関与していると考えられる。RPE細胞は視細胞の食食を一生継続するが、食食された細胞はオートファージ機構を使って分解され、そのペプチド断片がMHCII分子によって認識・制御されている可能性がある。ドルーゼンの生成を解明する基礎的な研究として今後の進展が期待される。

血漿プロテオーム解析においてユビキチン化されたタンパク質断片が加齢黄斑変性の患者血漿から検出されている。これらのタンパク質がどこに由来しているのか不明であるが、加齢黄斑変性の進行を組織中のタンパク質分解量で診断できる可能性が示唆された結果である。

本研究で得られた遺伝子多型情報や血漿タンパク質情報は今後開発される予防薬の対象となる患者を分類するために必要な情報として利用され、テーラーメイド医療へと応用されることを期待する。

4) 研究内容の効率性について：本研究は霊長類を疾患動物モデルとし、硝子体投与による薬効試験を行ったことにより、予想よりも実験に時間を要した。高い純度の補体抑制薬が調製され、毎週の硝子体投与にもかかわらず、炎症反応も観察されず1年間の薬効試験を無事に終わらせることができた。

5. 結論

本研究は加齢黄斑変性の原因解明と予防法の開発を目的として1) 世界で唯一の若年性黄斑変性カニクイザルの病理学的解析、2) 疾患サルを用いた補体抑制による予防法の開発、3) ヒト加齢黄斑変性のバイオマーカーの探索を目的とした感受性遺伝子の探索と機能解析、4) 血漿プロテオーム解析を行った。補体因子C3の活性化を抑えることにより、約半年でドルーゼンの拡散あるいは消失が確認された。また、日本人の滲出型加齢黄斑変性患者を対象とした感受性遺伝子の探索では染色体10番のLOC387715とHTRA1遺伝子領域にp値 1.0×10^{-14} のSNPが3つ検出された。HTRA1のノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを作製したところ、後者で脈絡膜の異常が観察された。血漿プロテオーム解析ではユビキチン化によって分解されたタンパク質が複数検出された。本研究で得られた補体抑制による予防法、感受性遺伝子、血漿タンパク質に関する情報は加齢黄斑変性の今後研究に応用されると期待される。

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. LOXL1 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, FORTLAUDERDALE2008) 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, FORTLAUDERDALE2008) M. Akahori, C. Oka, T. Iwata. Characterization of the Retina in Htral Deficient Mouse.

Association for Research in Vision and Ophthalmology, (USA, FORTLAUDERDALE2008) 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.

XVIII International Congress for Eye Research (China, Beijing2008) Takeshi. Iwata, Zai-Long. Chi, Fumie. yasumoto, Masakazu. Akahori, Minoru. Obazawa, Itaru. Kimura, Naoki. Nakaya, Stanislav. Tomarev. THREE POTENTIAL MOUSE MODEL FOR GLAUCOMA

XVIII International Congress for Eye Research (China, Beijing2008) Itaru. Kimura, Haru. Okamoto, Zai-Long. Chi, Masayoshi. Minami, Michihiro. Suzuki, Takeshi. Iwata. PROTEOM E ANALYSIS OF OCULAR CILIARY BODY

XVIII International Congress for Eye Research (China, Beijing2008) Zai-Long. Chi, Masakazu. Akahori, Minoru. Obazawa, Itaru. Kimura, Naoki. Nakaya, Atanislav. Tomarev. Masaki. Sasaoka, Atsushi. Shimazaki, Kazuhide. Kawasaki, Tetusya. Yamamoto, Takeshi. Iwata. Expression of Mutated optineurin leads to normal tension glaucoma in mice.

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

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

岩田岳 特願 2008-241209
トランスジェニック動物

Sensory Organs Society for Neuroscience 2008,

岩田岳 特願 2008-267716
緑内障のリスクの予測方法

(USA, WashingtonDC, 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.

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

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

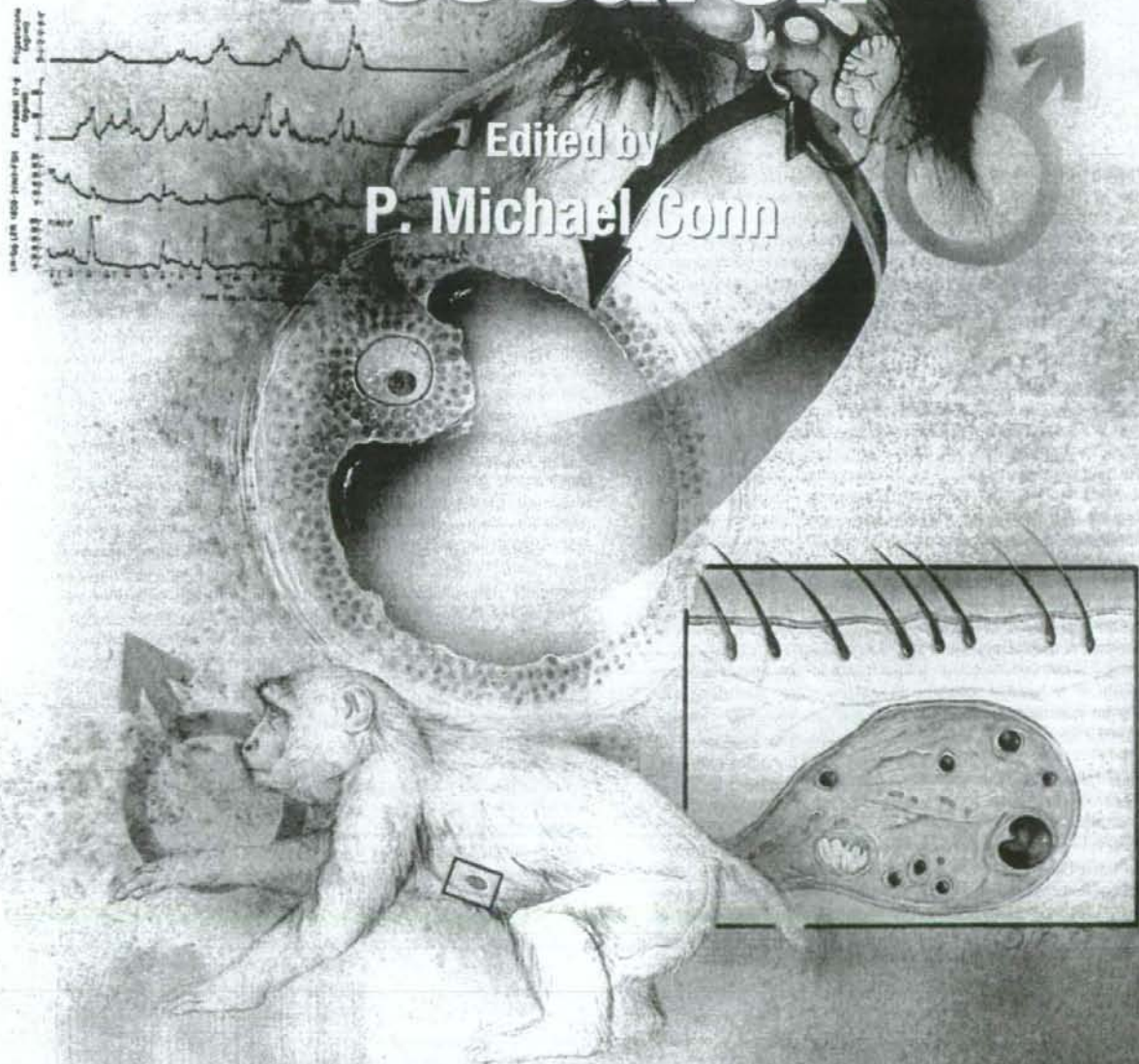
岩田岳 特願 2008-257430
糖尿病性末梢血管障害の検査のための方法、組成物およびキット

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

II. 研究成果の刊行物・別刷

Sourcebook of Models for Biomedical Research

Edited by
P. Michael Conn



 HUMANNA 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 Models 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

umanapress.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 factor play 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 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, Nouredine, 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

and proteomic techniques, the materials in drusen were found to be composed of molecules that mediate inflammatory and immune processes (Russell, Mullins, Schneider, and Hageman 2000; Mullins, Russell, Anderson, and Hageman 2000). These molecules include components of the complement pathway and modulators of complement activation, viz., vitronectin, clusterin, membrane cofactor protein, and complement receptor-1. In addition, molecules triggering inflammation, amyloid P component, α 1-antitrypsin, and apolipoprotein E, were identified in drusen. Cellular debris from macrophages, RPE cells, and choroidal dendritic cells has also been identified in drusen. Additional proteins such as crystallins, EEFMP1, and amyloid-beta have been also found in drusen. The presence of immunoreactive proteins and the oxidative modifications of many proteins in drusen imply that both oxidation and immune functions are involved in the pathogenesis of AMD. These findings suggest that complement activation triggers innate immune responses in the subretinal space. The co-distribution of IgG and terminal complement complexes in drusen indicate that immune responses that directly target antigens in retinal cells might also be occurring. Anti-retinal autoantibodies have been reported in a number of ocular disorders, e.g., macular degeneration in an aged monkey model.

5 Primate Model for AMD

Over the past few years, genetic engineering techniques have generated a number of animal models of AMD in mice, rats, rabbits, pigs, and dogs (Chader 2002). However in mammals, a well-defined fovea is found only in primates (humans and monkeys), and a search for a monkey line affected with macular degeneration has been persistent for a long time. A monkey with macular degeneration was first described by Stafford et al in 1974. They reported that 6.6 % of the elderly monkeys they examined showed pigmentary disorders and drusen-like spots (Stafford, Anness, and Fine 1984). El-Mofty et al reported that the incidence of maculopathy was 50% in a colony of rhesus monkeys at the Caribbean Primate Research Center of the University of Puerto Rico (El-Mofty, Gouras, Eisner, and Balazs 1978). At the Tsukuba Primate Research Center (Tsukuba City, Japan), Suzuki et al found a single cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) (Suzuki Monkeys) in 1986 with a large number of small drusen around the macular region (Nicolas, Fujiki, Murayama, Suzuki, Mineki, Hayakawa, Yoshikawa, Cho, Kanai 1996; Nicolas, Fujiki, Murayama, Suzuki, Shindo, Hotta, Iwata, Fujimura, Yoshikawa, Cho, Kanai 1996; Suzuki, Terao, and Yoshikawa 2003). This single affected monkey has multiplied to a large pedigree of more than 65 affected and 210 unaffected monkeys. Drusen were observed in the macular region as early as one year after birth, and the numbers increased and spread toward the peripheral retina throughout life. No histological abnormalities have been found in the retina, retinal vessels, or choroidal vasculatures of the eyes with drusen. However, abnormality in electroretinogram (ERG) were observed in sever case showing dysfunction of the macula.

Immunohistochemical and proteomic analyses of the drusen from these monkeys showed that the drusen were very similar to those in other monkeys with aged

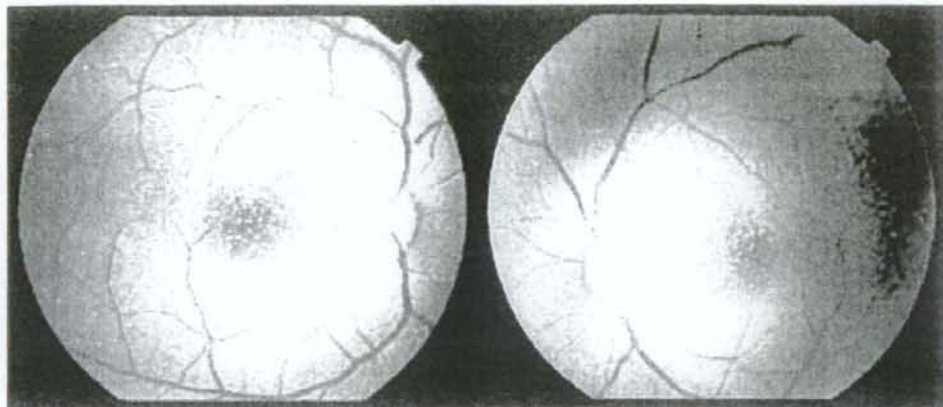


Fig. 1. Fundus photograph of both eyes of Suzuki Monkey showing accumulation of drusen (white spot) around the macular region.

macular degeneration sporadically found in older monkeys and also with human drusen (Umeda, Ayyagari, Allikmets, Suzuki, Karoukis, Ambasadhan, Zernant, Okamoto, Ono, Terao, Mizota, Yoshikawa, Tanaka, and Iwata 2005; Umeda, Suzuki, Okamoto, Ono, Mizota, Terao, Yoshikawa, Tanaka, and Iwata 2005; Ambati, Anand, Fernandez, Sakurai, Lynn, Kuziel, Rollins, and Ambati 2003). These observations have shown that the Suzuki Monkeys produce drusen that are biochemically similar to those in human AMD patients, but the development of the drusen occurs at an accelerated rate. More than 240 loci are being investigated to try to identify the disease causing gene and to understand the biological pathways leading to complement activation. Simultaneously, we have been studying a colony of aged monkeys which develop drusen after 15 years of birth.

Drusen components of these sporadically found affected monkeys were compared with human and Suzuki Monkeys by classical immunohistochemical techniques and by proteome analysis using mass spectrometer. Significant finding was that drusen contained protein molecules that mediate inflammatory and immune processes. These include immunoglobulins, components of complement pathway, and modulators for complement activation (e.g., vitronectin, clusterin, membrane cofactor protein, and complement receptor-1), molecules involved in the acute-phase response to inflammation (e.g., amyloid P component, α 1-antitrypsin, and apolipoprotein E), major histocompatibility complex class II antigens, and HLA-DR antigens (Umeda et al. 2005). Cellular components have also been identified in drusen, including RPE debris, lipofuscin, and melanin, as well as processes of choroidal dendritic cells, which are felt to contribute to the inflammatory response. In addition to immune components, a number of other proteins were found in drusen. These appear to be vitronectin, clusterin, TIMP-3, serum amyloid P component, apolipoprotein E, IgG, Factor X, crystallins, EEFMP1, and amyloid-beta. The presence of immunoreactive proteins and oxidative modified proteins implicate both oxidation and immune functions in the pathogenesis of AMD.