

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>

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

I. 総合研究報告

目次

I. 総合研究報告

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

岩田 岳	国立病院機構東京医療センター臨床研究センター
三宅 養三	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻
寺尾 恵治	医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター
吉川 泰弘	東京大学大学院農学生命科学研究科
溝田 淳	順天堂大学医学部浦安病院眼科
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
西村 俊秀	東京医科大学臨床プロテオームセンター
松野 聖	参天製薬(株)開発研究センター

II. 研究成果の刊行物・別刷

平成18年度 厚生省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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

総合研究報告書

主任研究者	岩田 岳	東京医療センター臨床研究センター 室長
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 助手

研究要旨：遺伝性の黄斑変性カニクイザルを使って補体抑制による加齢黄斑変性の予防を試みる。補体 C3 因子、補体 C5 因子をターゲットにした補体抑制薬を確保し、来月から霊長類医科学研究センターで実験が開始される。また、原因遺伝子の探索、ヒト加齢黄斑変性のリスク遺伝子の解明が行われた。リスク遺伝子の解明は加齢黄斑変性の始点を明らかにしたことになり、今後の機能解析が期待される。遺伝子解析と平行して血漿プロテオーム解析によって血漿蛋白（疾患バイオマーカー）の微量な変化を検出し、早期診断に応用できるか検討中である。これらの情報は総合的なデータベースと検索システムに統合され、加齢黄斑変性の早期発見、予防法の選択に利用できるように構築する。

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

A. 研究目的

黄斑は角膜と水晶体によって収束した光が網膜上で結像する領域で、光を感じる視細胞が最も密に集中する。ここは視力を決定する重要な部位であり、障害されると著しい視力低下、ひいては失明に至る。代表的な疾患として難治性疾患加齢黄斑変性がある。加齢黄斑変性は米国では65歳以上で失明率が最も高い眼疾患であるが、日本でも急速な高齢化と生活の欧米化によって患者数は急増しており、その原因解明と予防・治療法の開発が急がれている。

黄斑は高解像度の視力を獲得した霊長類でのみ発達し、通常の実験に使用されるマウスやラットなどの夜行性げっ歯類には存在しない。根本的な予防法や治療法が確立できない理由の1つとして、黄斑のある疾患動物が存在しなかったことが原因と考えられる。

（独）医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで発見された黄斑変性カニクイザルは

生後2年でドルーゼンを発症する世界で唯一の動物モデルである。ドルーゼンの生成は加齢黄斑変性の特徴で、ヒトでは50歳以上で蓄積が観察されているが、若年黄斑変性カニクイザルはその1/25の時間で観察されている。

我々はドルーゼンの組成に補体活性分子が存在することから補体活性経路が合流するC3及びC5補体因子の抑制によってドルーゼンの蓄積を抑制し、加齢黄斑変性の予防法として利用できるか疾患サルをつかった動物実験によって明らかにする。すでに補体抑制効果が確認されているC3及びC5抑制薬を選択して平成19年5月からの実験開始に向けて準備中である。

疾患が優性遺伝することから単一の遺伝子変異によって発症すると考えられる。このメカニズムを解明するには原因遺伝子の同定が不可欠であり、現在マカカ属用の連鎖解析マーカーによって解析が行われている。

疾患サルの研究と平行してヒト加齢黄斑

変性がどのような原因で発症するのか、加齢黄斑変性の患者から採血して、DNA 150 検体（健常者 200 検体）と血漿 50 検体（健常者 50 検体）が収集された。リスク遺伝子の探索には 50 万遺伝子多型 (SNP) チップが用いられた。疾患によって血漿組成が変化すると予測され、加齢黄斑変性の血漿中に疾患バイオマーカーとなる微量蛋白の変化が観察されるか、血漿プロテオーム解析法によって探索を行った。

本研究は加齢黄斑変性の早期診断と予防法の確立によって発症を抑えることを目的とした総合的な研究事業である。

B. 研究方法

1) 補体抑制実験に用いる霊長類モデル：

我々はこれまで国立医薬基盤研究所霊長類医学研究センターで発見された世界で唯一のドルーゼンを発症する若年性黄斑変性カニクイザルの病理学的及び分子生物学的解析を行ってきた。この疾患サルでは 50 歳以上のヒト加齢黄斑変性の初期に観察される網膜下に蓄積物（ドルーゼン）が生後 2 年で観察される。我々はドルーゼンの組成に補体活性因子が含まれていることを発見し (Umeda, Iwata et al, IOVS 2005, Umeda, Iwata et al, FASEB J 2005)、また、最近の研究によって補体活性化による網膜下の局所的な炎症反応が加齢黄斑変性の原因として考えられことから、C3 及び C5 補体抑制剤による予防法の確立を試みる。

これまでドルーゼンは観察されていたが、網膜機能への影響については調べていなかった。今回三宅養三先生によって開発された、局所 ERG（網膜電位）測定装置を用いて、特にドルーゼンの蓄積が多い疾患個体について黄斑部における機能評価を行った。

疾患カニクイザルモデルとして、遺伝性の黄斑変性カニクイザル、Lipopolysaccharide による網膜下における人工的な補体活性化によるドルーゼンや血管新生の誘発モデル、ブルッフ膜へのレーザー照射による脈絡膜血管新生誘発モデルを用いた補体抑制剤によるドルーゼンの抑制及び血管新生の抑制に

よる加齢黄斑変性の予防を試みる。Lipopolysaccharide による補体活性化誘発モデルについてはウサギで検討中である。

2) 網膜へのドラッグデリバリー：

ドラッグデリバリーには硝子体に埋め込める、生分解性の素材で作られた小型カプセル（球、筒状）に補体抑制剤を詰めて、6-12ヶ月の薬効を観察する。補体の古典経路や2次経路を特異的に抑制する2種類の薬剤を検討する。試作版はすでに開発済みであるが、サルの硝子体への打ち込みの前にウサギで実験を繰り返す計画である。

3) 補体抑制剤による動物実験：

補体抑制剤として C3 補体因子の活性を抑制する Compstatin (Lambris et al, J. Immunol. 2000) について 1 年分を確保し、50 マイクログラムを 1 週間単位で、1 ミリグラムを 1 ヶ月単位で硝子体内へ注入する。また、名古屋市立大学名誉教授の岡田秀親先生が補体因子 C5 に対する抑制剤を開発され、蛋白研究所 (株) によって徐放剤の開発が行われる。これら 2 つの強力な補体抑制剤を用いて、霊長類モデルを使って、ドルーゼンの蓄積を抑制または消失できるか、世界で初めての試みに挑戦する。この情報は支援情報システムのデータとしても利用される。

(4) 予防・治療法の条件設定を支援するための支援情報システムの構築：

実験期間中に収集するデータはドラッグデリバリー法の生分解性能、補体抑制効果、疾患個体の所見、加齢黄斑変性患者の遺伝子解析結果、加齢黄斑変性患者の血漿解析結果など、形式の異なるデータ（数値データ、テキスト、画像、カテゴリカルデータ、配列情報）をそれぞれ関連付けてデータベース化する必要がある。補体抑制効果が最大限に得られる条件をデータベースから予測できるようにするために、データマイニング機能を開発中である。また、膨大な解析結果を直感的に把握するためのクラスター表示、チャート表示、グラフ表示などの機能を盛り込むためのデータ可視化技術の開発もデータマイニングと平行して開発中である。データマイニ

ングソフトウェアOmniViz(R) Ver3.6.1 (インフォコム)等を参考に、これらのソフトウェアを組み合わせて、バイオリジカルデータとケミカルデータ、各種実験解析結果とシミュレーション結果、文献データ、パスウェイ情報、そして特許情報なども含めて統合的に利用できるシステムを構築したい。

(5) 若年性加齢黄斑変性カニクイザルの原因遺伝子の解明:

若年性黄斑変性カニクイザルは常染色体優性遺伝しており、単一遺伝子の変異によって代謝が乱れ、ドルーゼンの蓄積を解消することができない状態にあると考えられる。この遺伝子の発見はドルーゼンの生成過程を解明し、新たな加齢黄斑変性の診断や予防・治療法の開発に結びつく可能性がある。染色体6qに疾患との連鎖が観察され、この周辺の遺伝子に網膜、網膜色素上皮細胞あるいは脈絡膜で発現する遺伝子をRT-PCRによって確認して、クローニング、遺伝子解析を行う。染色体6q以外についても連鎖解析を継続する(GeneMapperTM ソフトウェア v.3.0、Applied Biosystems Japan)。

(6) 加齢黄斑変性リスク遺伝子の探索:

加齢黄斑変性の患者 DNA 検体500検体を目標に複数の国立病院、順天堂大学医学部浦安病院眼科(溝田 淳)、香川大学医学部眼科学教室(白神 史雄)、宮崎大学眼科(直井 信久)、杏林大学医学部アイセンター(岡田アナベルあやめ)が参加して、1500のDNA 検体が集められた。このうち1000のDNA 検体と対象となる健常者の200DNA 検体を用いてAffymetrix社の50万SNP(遺伝子多型)チップを用いて解析した。

(7) 加齢黄斑変性血漿バイオマーカーの探索:

加齢黄斑変性の遺伝子解析と平行して、血漿成分の変化によって疾患の早期発見が可能か、検討が行われている。国立病院機構東京医療センターと順天堂大学医学部浦安病院眼科によって加齢黄斑変性患者の血漿50検体を集め、その対象として白内障患者の血漿50検体が集められた。血漿中には22

種類の蛋白が99%を占めるために、まずはこれを除くために、東レ株式会社が開発した低分子量蛋白分画装置のプロトタイプを使って分画を行い、その後、逆相クロマトグラフィー、トリプシン処理、2次元クロマトグラフィーを経て、質量分析計によるプロテオーム解析を行う。すでに低分子分画は完了している。遺伝子解析の結果と血漿蛋白の変動が相関するか、今後の実験結果が期待される。

C. 研究結果

1) 補体抑制実験に用いる霊長類モデル:

疾患カニクイザルのドルーゼンについて継時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ことが明らかになった。この事実から補体抑制薬の効果を観察するには生後2年の疾患サルを対象に実験するのが適切かと考えられる。

これまでドルーゼンの蓄積は観察されたが、ドルーゼンの網膜機能への影響については病理学的観察しかなされていなかった。今回、三宅先生が開発された局所ERG測定装置を使って、黄斑を中心として5°、10°、15°の角度の範囲で光に対する網膜の反応を計測した結果、疾患個体の黄斑部では反応が消失していることが明らかになった。疾患サルは萎縮型の黄斑変性を発症していると考えられる。

2) 網膜へのドラッグデリバリー法の開発:

補体抑制薬は何れも低分子のペプチドであることから未修飾であれば比較的短い時間で分解される。硝子体への注入間隔は数ヶ月から半年単位が理想的であり、このための叙法剤の開発が行われている。まずは補体抑制薬の直接的な効果を測定したいので、未修飾の薬を1週間から1ヶ月単位で硝子体に注入する。

3) 補体抑制薬による動物実験:

補体抑制薬として補体因子C3の活性を抑制するCompstatinについて1年分を確保し、50マイクログラムを1週間単位で、1mg

を1ヶ月単位で硝子体内へ注入する。また、C5 補体因子に対する抑制剤もその効果を調べる。補体抑制剤を用いて霊長類モデルのドルゼンを抑制または消失させる実験は世界で初めてである。

(4) 予防・治療法の条件設定を支援するための支援情報システムの構築：

平成13-15年に行われた感覚器障害研究事業で構築された加齢黄斑変性症例登録システムをベースにして、実験期間中に得られるデータを総合的に収集するシステム開発が行われている。患者症例情報に加え、患者遺伝子情報、患者血漿蛋白情報、ドラッグデリバリーの生分解性能、補体抑制能などが総合的にデータベース化され、情報の検索だけでなく、入力情報の内容によって適切な支援情報が出力されるように開発中である。

(5) 若年性加齢黄斑変性カニクイザルの原因遺伝子の解明：

2006年に発表されたマカカ属の連鎖解析マーカーを用いて生存する個体から抽出されたDNA検体についてフラグメント解析に続き、連鎖解析が行われた。2005年以前に行ったヒト用連鎖解析マーカーとは異なり、PCR産物がポリモルフィックであった。この解析によって染色体6qに疾患との連鎖が観察され、この周辺の遺伝子に網膜、網膜色素上皮細胞あるいは脈絡膜で発現する遺伝子があるか探索中である。

(6) 加齢黄斑変性リスク遺伝子の探索：

加齢黄斑変性の患者DNA検体500検体を目標に複数の国立病院、順天堂大学医学部浦安病院眼科(溝田 淳)、香川大学医学部眼科学教室(白神 史雄)、宮崎大学眼科(直井 信久)、杏林大学医学部アイセンター(岡田アナベルあやめ)が参加して、150のDNA検体が集められた。このうち100のDNA検体と対象となる健常者の200DNA検体を用いてAffymetrix社の50万SNP(遺伝子多型)チップを用いて解析した。結果、患者特有の遺伝子多型(SNP)を選別することに成功した。これらのSNPをグループ化し、ハプロタイプとして計算した結果、リスク遺

伝子を選別することに成功した。日本人による日本人患者を対象にした、このような遺伝子多型解析は初めてであり、日本人の加齢黄斑変性の根幹に関わる情報を得たと考えている。この内容は特許出願中である。この遺伝子群の機能解析に向けた実験計画を立案中である。

(7) 加齢黄斑変性血漿バイオマーカーの探索：

血漿成分によって疾患の早期発見が可能か検討している。東レ株式会社が開発した低分子量蛋白分画装置を用いてアルブミンやグロブリンなどの主蛋白が除かれ、その残りの分画について逆相クロマトグラフィーを行った結果、加齢黄斑変性患者と白内障患者のクロマトグラムには大きな差が観察された。これからフラクション別にトリプシン処理を行い、2次元クロマトグラフィーでさらに分画した後に質量分析計によってプロテオーム解析を行う。

D. 考察

本研究では世界で唯一の霊長類黄斑変性モデルを利用した補体抑制による加齢黄斑変性の予防を試みる。補体の活性化を抑制することは活性化の原因となっている未知の物質を野放しにすることになり、これによって網膜の傷害が進むのか、あるいは補体活性化によって周辺網膜が障害されているために、これを抑制することによって予防できるのか、加齢黄斑変性の根本的な質問に本実験は答えることができると考えられる。

疾患の原因となっている遺伝子の同定はカニクイザルであるがために、ゲノム情報が乏しく、連鎖解析マーカーの数に限りがあるために難航していたが、徐々にその遺伝子座が絞り込まれている。来年度にはさらに絞り込みができると期待される。

加齢黄斑変性患者と健常者について50万種類のSNPを比較した結果、統計学的にきわめて優位な数値として複数のリスク遺伝子がリストされてきた。この中にはすでに米国グループによって明らかにされた遺伝子

も含まれているが、その他にも同等な確からしきで複数の遺伝子が発見された。これらの遺伝子について今後総合的なアプローチによる機能解析を行う計画であり、疾患サルの候補遺伝子としても検討していく。

今回発見されたリスク遺伝子によって早期診断の可能性が生まれたが、発症の時期までは遺伝子検査によって予測することは困難である。遺伝子検査に加えて、発症前に硝子体中の蛋白組成を検査することが理想的ではあるが、現実的には不可能であり、血漿中の蛋白組成を測定することによって発症時期の予測が可能か検討している。低分子蛋白を分画し、これを逆相クロマトグラフィーによって分画されたクロマトグラムからは白内障患者と加齢黄斑変性患者の血漿組成は顕著に異なることが明らかにされた。しかしながらこれが加齢黄斑変性に特異的な変化であるかは今後の詳細なプロテオーム解析の結果を待ちたい。

E. 結論

遺伝性の黄斑変性カニクイザルを使って補体抑制による加齢黄斑変性の予防を試みる。C3 補体因子、C5 補体因子をターゲットにした補体抑制薬を確保し、来月から霊長類医学研究センターで実験が開始される。また、原因遺伝子の探索、ヒト加齢黄斑変性のリスク遺伝子の解明が行われた。リスク遺伝子の解明は加齢黄斑変性の始点を明らかにしたことになり、今後の機能解析が期待される。遺伝子解析と平行して血漿プロテオーム解析によって血漿蛋白の微量な変化を検出し、早期診断に応用できるか検討中である。これらの情報は総合的なデータベースと検索システムに統合され、加齢黄斑変性の早期発見、予防法の選択に利用できるようにしたい。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Utsunomiya T, Okamoto M, Wakiyama S, Hashimoto M, Fukuzawa K, Ezaki T, Aishima S, Yoshikawa Y, Hanai T, Inoue H, Barnard GF, Mori M. A specific gene-expression signature quantifies the degree of hepatic fibrosis in patients with chronic liver disease. *World J*

Gastroenterol. 2007 13:383-90.

Bak E, Ishii Y, Omatsu T, Kyuwa S, Tanoue T, Hayasaka I, Yoshikawa Y. Sequence analysis of major histocompatibility complex class-II DQB1 (Patr-DQB1) alleles in chimpanzees by polymerase chain reaction-based methods. *Hum Immunol.* 2006 Aug;67(8):655-63. Epub 2006 .

Tominaga T, Negishi T, Hirooka H, Miyachi A, Inoue A, Hayasaka I, Yoshikawa Y. Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology.* 2006 226:208-17.

Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K.

Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci.* 2006 68:507-10.

Bak EJ, Ishii Y, Omatsu T, Kyuwa S, Tetsuya T, Hayasaka I, Yoshikawa Y.

Identification and analysis of MHC class II DRB1 (Patr-DRB1) alleles in chimpanzees. *Tissue Antigens.* 2006 67:134-42.

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.

3: 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.

Yasukawa T, Wiedemann P, Hoffmann S, Kacza J, Eichler W, Wang YS, Nishiwaki A, Seeger J, Ogura Y. Glycooxidized particles mimic lipofuscin accumulation in aging eyes: a new age-related macular degeneration model in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007 Apr 4; [Epub ahead of print]

Yasukawa T, Ogura Y, Kimura H, Sakurai E, Tabata Y. Drug delivery from ocular implants. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006 3:261-73.

Nomiyama H, Otsuka-Ono K, Miura R, Osada N, Terao K, Yoshie O, Kusuda J.

Identification of a novel CXCL1-like chemokine gene in macaques and its inactivation in hominids. *J Interferon Cytokine Res.* 2007 27:32-7.

Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K, Mukai R.

Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. *Virus Genes*. 2007 Jan 26; [Epub ahead of print]

Yasuda T, Miyachi S, Kitagawa R, Wada K, Nihira T, Ren YR, Hirai Y, Ageyama N, Terao K, Shimada T, Takada M, Mizuno Y, Mochizuki H. Neuronal specificity of alpha-synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. *Neuroscience*. 2007 144:743-53.

Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, Terao K. Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta-related neuritic degeneration. *J Neurosci Res*. 2006 84:782-9.

Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2006 329:459-67.

Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K. Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci*. 2006 68:507-10.

Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey embryonic stem cells in the allogeneic setting. *Stem Cells*. 2006 24:1450-7.

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葉出版 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」

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」

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、2
007)

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
(ブエノスアイレス、アルゼンチン、200
6)

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 |

質量分析による疾患組織及び血漿の組成解析

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

研究要旨: 白内障患者血漿を対照として、加齢性黄斑変(AMD)性患者の血漿プロテオーム解析を行った。血漿中より微量蛋白質検出の妨害となる多量存在タンパク質(ヒト血清アルブミン、IgG)を除去した後、得られた総タンパク質をトリプシンによりペプチド断片化し、液体クロマトグラフィー/質量分析装置(LC-MS)で測定した。LC-MS用発現解析ソフトを用い、AMD患者で増減するタンパク質を10同定した。これらについては検証と詳細な解析が必要である。

A. 研究目的

加齢性黄斑変性は欧米先進国で多く見られ我が国でも患者数が増加している。しかし確実な治療法はなく早期発見・早期治療が重要とされている。そこで血漿中より黄斑変性特異的に変動する蛋白質を見出すことにより、ヒト加齢性黄斑変性発症を早期診断できる蛋白質マーカーを探索する事は有用である。また黄斑は霊長類や鳥類で発達しており、実験動物のラットやマウスなど夜行性ゲッ歯類にはないため、加齢黄斑変性のモデル動物は見いだされていず、その発症過程ははまだ解明されていない。然しながら、最近になり国立感染症研究所筑波霊長類センターにおいてカニクイザルで若年性黄斑変性を発見した。その疾患部である網膜色素上皮細胞であるブルッフ膜に蓄積物(ドルーセン)の分析組成がヒトのそれと類似していることを見出している。このモデル動物は、ヒトの加齢性黄斑変性の発現機構を解明し、今まで対処法がなかった治療の実現という観点から世界的にも貴重である。

本分担研究では、患者血漿を用い黄斑変性において血漿に反映される特異的蛋白質を見出すことにより、ヒト加齢性黄斑変性発症を早期診断できる蛋白質マーカーを探索することを目的とする。また、黄斑変性の発現機構を解明する目的で黄斑変性を発症していないカニクイザルの黄斑部位試料をコントロールとして用い、黄斑変性により形成されたドルーセンに含まれる低存在量蛋白質を含めたプロテオーム解析研究を行う。

B. 研究方法

血漿中から黄斑変性関連タンパク質を同定する方法として血漿の大部分を占める血清アルブミンおよび免疫グロブリンG(IgG)を除去後、低存

在の多様な蛋白質群の定量及び同定解析を行い、このプロテオーム解析から黄斑変性に関わる蛋白質を検出同定する。対照として健康人血漿を用いた場合黄斑変性特異的蛋白質の判別が困難になると考え、背景の似た同じ眼疾患である白内障患者血漿を対照として用いた。検出したペプチドからの蛋白質同定には SEQUEST 及び MASCOT などの検索エンジンによりヒト蛋白質を中心としたデータベースを検索し同定する。タンパク質発現量比較はペプチド断片単位で、イオン強度を比較することにより行う。ドルーセン蓄積分子類を同定する方法として1)パラフィン固定された既存試料による解析手法の検討、2)新たに若年性黄斑変性カニクイザルからフレッシュのままドルーセン部位を剥離し、これから蛋白質を抽出して、一次元電気泳動法によりドルーセン特異的な蛋白質バンドの有無の検討、及び可溶性抽出蛋白質を全消化してペプチド混合物とし液体クロマトグラフィーを中心とした分離画系とタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いて検出を行う。

本年は、アルブミン、IgG除去血漿を用いた黄斑変性患者のLC-MS/MS測定を行い、白内障患者と比較し疾患特異的タンパク質の同定を行った。

C. 研究結果

現在までに加齢性黄斑変性16例、白内障12例の血漿を入手している。昨年までに、このうち年齢を比較的揃えた各6例(表1)について測定を行った。血漿よりアルブミン、IgGを除去した試料のSDS-PAGEを行ったが顕著な変化は認められなかった。LC/MS/MSではAngiotensinのシグナルが白内障特異的に検出された。

本年はさらにこれらのLC-MS/MS測定データをプロテオーム解析用ラベルフリー定量ソフト

DeCyderMS®(GE Healthcare Bioscience)を用い発現解析を行った。その結果タンパク質同定ソフトMASCOTのスコア25以上で、AMD特異的に減少するタンパク質7種、白内障にのみ検出されたタンパ

ク質3種が検出された(表2)。AMD特異的またはAMDで上昇するシグナルはいくつか得られたが同定された物は1タンパクのみだったが同定スコアが25と低く信頼性に問題があった。

表1 血漿試料

試料番号	疾患名	年齢	性別
A01	黄斑変性	73	女性
A02	黄斑変性	79	女性
A04	黄斑変性	74	女性
A14	黄斑変性	74	男性
A15	黄斑変性	73	男性
A16	黄斑変性	65	男性
C01	白内障	70	男性
C02	白内障	74	女性
C03	白内障	84	女性
C05	白内障	88	男性
C10	白内障	69	男性
C12	白内障	62	女性

表2 発現比較定量解析結果

Av. Ratio	t-test p	ID Details	Peptide sequence	ID Score
0.68	0.0025	(P02671) Fibrinogen alpha/alpha-E chain precursor	NPSSAGSWNSGSSGPGSTGNR	140
0.51	0.00012	(P02679) Fibrinogen gamma chain precursor	EGFGHLSPGTTEFWLGNEK	104
0.55	0.00232	(P02679) Fibrinogen gamma chain precursor	IHLISTQSAIPYALR	98
0.69	0.00631	(P19652) Alpha-1-acid glycoprotein 2 precursor (AGP 2)	EQLGEFYEALDCLCIPR	35
0.56	0.00001	(O8TAP6) Centrosomal protein of 76 kDa (Cep76 protein)	TTSISAGNEEFQDAIR	33
0.66	0.00012	(Q14690) RRP5 protein homolog (Programmed cell death protein 11)	EHVDVIAK	31
0.63	0.00229	(Q9H9E3) Conserved oligomeric Golgi complex component 4	QGKEGSMIDANLK	27
2.03	0.00042	(Q9P232) Contactin 3	VAGNETSARLR	25
白内障のみ		(P01042) Kininogen precursor [Contains: Bradykinin]	YFIDFVAR	56
白内障のみ		(Q01064) Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B	LMQDDEMFINILTK	41
白内障のみ		(P02787) Serotransferrin precursor (Transferrin)	NLNKEYELLCLDGTGTR	26

D. 考察

今回は白内障で発現量が多いまたは特異的なタンパクが9種同定されている。しかし同定スコアが低い物も多くさらなる検証が必要である。スコアが高い物としてFibrinogen、Kininogenがあり補体・血液凝固系がなんらかの関与をしている事が示唆される。昨年度検出されたangiotensinは同定はされたが有意な変化ではなかった。しかしながら白内障での増加傾向は認められた。黄斑変性で特異的に上昇するシグナルはcontactin3のみであるがこれは同定スコアが低いため検証が必要である。

今後、検体数を増やしこれらのタンパクについ

での検証を行い、さらに多次元液体クロマトグラフィーで高感度の測定を行い、より多くの蛋白質を同定してでの比較定量を検討中である。

E. 結論

本年は黄斑変性特異的蛋白質の検出を行う目的で患者血漿の1D-LC-MS/MS測定データの解析を行った。しかしながら黄斑変性で減少するタンパクはいくつか同定されたが、黄斑変性で増加するタンパクは1タンパクのみであり、黄斑変性特異的に発現しているタンパク質は同定出来なかった。2D-LC-MS/MSなど、さらに詳細な解析を行うことで黄斑変性特異的蛋白質の検出が期

待される。本分担研究のもう一つ目的であるドルーセン物質の同定、ドルーセン領域のプロテオーム解析は一部一昨年度報告しており、現在も平行して進行中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(ア) Nishimura T, Ogiwara A, Fujii K, Kawakami T, Kawamura T, Anyoji H, Kato H, Disease proteomics toward bedside reality, *J. Gastroenterol.*, 40, 7-13, (2005)

(イ) Fujii K, Nakano T, Kanazawa M, Akimoto S, Hirano T, Kato H, Nishimura T., Clinical-scale high-throughput human plasma proteome analysis: Lung adenocarcinoma, *Proteomics*, 5, 1150-1159, (2005)

(ウ) Matsumoto M, Hatakeyama S, Oyamada K, Oda Y, Nishimura T, and Nakayama K., Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome, *Proteomics*, 5, 4145-4151 (2005)

(エ) Kawakami T, Tateishi K, Yamano Y, Ishikawa T, Kuroki K, Nishimura T., Protein identification from product ion spectra of peptides validated by correlation between measured and predicted elution times in liquid chromatography/mass spectrometry, *Proteomics* 5, 856-864, (2005)

2. 口頭発表

1. Hisae Anyoji, Mitsuhiro Kanazawa, Hsiao-Kun Tu, Takao Kawakami, Toshihide Nishimura, Atsushi Ogiwara, Quantitative Proteomics Analysis System i-OPAL (ThP531), 53rd American Society for Mass Spectrometry Conference, San Antonio, Texas, June 5-9, 2005

2. Kiyonaga Fujii, Tomoyo Nakao, Shoichi Kawasaki, Fumihiko Usui, Yasuhiko Bando, Toshihide Nishimura, A Complementary Protein Characterization by 2D-Micro LC/NSI-ITMS for both Intact Protein and Shotgun Analysis (TP497), 53rd American Society for Mass Spectrometry Conference, San Antonio, Texas, June 5-9, 2005

3. K. Fujii, T. Nakano, S. Kawasaki, T. Nishimura et al. Complementary Protein Characterization by 2D-microLC/NSI-ITMS for Both Intact

Protein and Shotgun Analyses, 53rd American Society for Mass Spectrometry Conference, San Antonio, Texas, June 5-9, 2005

4. 西村俊秀, 臨床プロテオーム解析による疾患マーカー探索, 医薬基盤研究所連携フォーラム(2005.12.19-20), 大阪

5. 西村俊秀, 臨床プロテオームプロテオミクスによる疾患関連分子探索, 第2回ゲノム医療情報シンポジウム, セッション3 機能オミックスと医療応用 (2005.10.21) 東京ファッションタウン

6. 西村俊秀, 平野隆, 加藤治文, 臨床プロテオームの実際と展望, 日本ヒトプロテオーム機構第3回大会 (2005.8.1-2) 横浜

7. 福田真嗣, 鈴木裕義, 小森邦弘, 川村 猛, 浅沼成人, 日野常男, 消化管細菌 *Butyrivibrio fibrisolvens* の共役リノール酸還元酵素遺伝子の解析, 第28回日本分子生物学会年会 (2005.12.7-9) 福岡

8. 京野 完, 川村 猛, 石塚雄一, 平野 稷, 西村俊秀, 血漿プロテオーム解析におけるラベルフリー比較定量, 日本ヒトプロテオーム機構, 第3回大会 (2005.8.1-2) 横浜

9. 西村俊秀, 基礎プロテオミクスから臨床プロテオミクスへ, 第1回日本臨床プロテオーム研究会 (2005.10.15) 新宿

10. 藤井清永, 中野智世, 川崎彰一, 碓井史彦, 板東泰彦, 西村俊秀, インタクトタンパク質と消化ペプチドを用いる補完的プロテオーム解析法の開発 (1) インタクトタンパク質のLC/MS分析 (3P-P3-20), 第53回質量分析総合討論会 (2005.5.25-27) さいたま

11. 石塚雄一, 藤井清永, 西村俊秀, 平野稷, ショットガンプロテオミクスにおけるDeCyder™MSを用いた比較定量解析 (3P-P3-23), 第53回質量分析総合討論会(2005.5.25-27)さいたま

12. 西村俊秀, 統合的プロテオーム技術による疾患マーカー探索, ゲノム創薬フォーラム キーテクノロジー2005 (2005.9.12) 東京国際フォーラム

13. 川村 猛, 第28回日本分子生物学会年会 バイオテクノロジーセミナー, 最先端が加速する基礎から臨床への道, アマシャムバイオサイエンス主催, DeCyder MS を利用したペプチドレ

ベルでの疾患マーカー探索(2005.12.7)福岡

14. 川村 猛, プロテオミクスセミナー—プロ
テオミクスの現状と今後の展開—ノンラベル定
量法による疾患関連タンパク質の探索
(2005.7.13) 東京 (東京大学山上会館)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

若年性家族性網膜黄斑変性カニクイザルを用いた治療法 評価を目的とした病態の継時的進行の確認

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）
研究協力者 鈴木通弘（社団法人・予防衛生協会）

研究要旨

加齢黄斑変性疾患(AMD)を自然発症するカニクイザルを用いて新規治療法または薬効を評価するためには、黄斑部の病変が加齢に伴い進行することを確認しておく必要がある。今年度は、霊長類医科学研究センターで維持しているカニクイザルのAMDモデルで病態の進行が認められるか否かを眼底観察で確認した。2歳齢から5歳齢まで継時的に眼底観察を行った4頭ではいずれも成長に伴い黄斑部の病変が拡大していること、左右の眼底の病態進行がほぼ同程度であることが確認できた。これにより、本研究で使用予定のカニクイザルAMDモデルでは左右眼共に加齢に伴い病態が進行することから、片眼に治療候補薬を他眼に対照薬を投与することにより、ADMの進行阻害を標的として、新規治療法および治療薬の有効性が評価できると判断した。

キーワード：カニクイザル、網膜黄斑変性症、
遺伝性疾患モデル、有効性評価

A. 研究目的

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見いだされたカニクイザルの若年性網膜黄斑変性家系は、ヒトの加齢性網膜黄斑変性症の発症機序および治療法、予防法の開発に有用なモデル動物と考えられている。本モデルを用いて新規治療薬および治療技術の有効性を評価するためには、2～3歳齢で発症した後、加齢（成長）にともない黄斑部の病変が進行することを確認しておく必要がある。今年度は、これまでに2～3年間隔で病変部の眼底観察を継時的に行っている発症個体について、成長後の眼底を観察し、加齢に伴う病態進行の有無を確認することを目的とした。

B. 研究方法

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで維持されている網膜黄斑変性家系のうち、継時的に眼底観察を行っている4頭（雌

2頭：3歳、7歳、雌2頭：3歳、5歳）について、加齢に伴う網膜黄斑部の病態変化を調査した。眼底観察および撮影の20分ほど前にトロピカミド・塩酸フェニレフリン（ミドリンP、参天製薬株式会社）を動物の両眼に1～2滴滴下した。散瞳後に、塩酸ケタミン（ケタラル50、三共製薬株式会社）の10mg/kg（体重）を筋肉内に投与して全身麻酔し、携帯用眼底カメラ（RC-2、興和株式会社）により眼底の観察・記録を行った。普通撮影時は国産カラーフィルム（Fujichrome ASA 100、富士フィルム株式会社）を用いた。

病変部の症状の程度は以下の基準で評価した。

軽度：両眼の黄斑部に非常に細かい灰白色から黄白色の斑点が約20ヶ認められるもの

中度：両眼の黄斑部に非常に細かい灰白色から黄白色の斑点が20から50ヶ認められるもの

重度：両眼の黄斑部に非常に細かい灰白色から黄白色の斑点が50ヶ以上認められるもの

の

G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

C. 研究結果および考察

図 1、2、3 に今回加齢に伴う黄斑部の病態変化を調査した 4 頭の内 1 頭の左右眼底写真を示す。本個体は 1999 年生まれの 7 歳齢雌で、2.5 歳の時点で ADM と判定された個体である。本症例では左眼 (図 2)、右眼 (図 3) とともに、2.5 歳齢、7 歳齢と加齢に伴い黄斑部の変性病変の拡大と病斑点の増加が認められている。すなわち、霊長類医科学研究センターで維持しているカニクイザルの ADM モデルでは時間経過と共に病態が進行することが確認された。図は省略するが、病態進行の程度は異なるものの調査した 4 頭すべてで両眼とも変性病態の加齢性進行が 2 年単位で確認できることがわかった。ADM 治療候補薬の薬効評価では、病態の進行阻害が最も期待されているものであり、今回の結果から、片眼に治療候補薬を他眼にブラシーボを投与することにより、病態進行を遅延させる薬効評価が可能と判断した。

現在霊長類医科学研究センターでは十数頭の発症を確認した ADM カニクイザルが維持されている。これらのサルは 1-2 年ごとの継時的な眼底変化が記録されており、薬効試験に供試可能である。

E. 結論

霊長類医科学研究センターで維持している家族性 ADM モデルカニクイザルについて、加齢 (成長) に伴う黄斑部病変の病態進行の可否を調査した結果、調査した 4 頭共に 1-2 年の観察間隔で病変部の拡大と病変斑点の増加が両眼で観察された。このことから、本モデルを対象として黄斑変性病態の進行阻害を標的とした薬効評価試験が実施可能であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

図1:1319907042の眼底変化

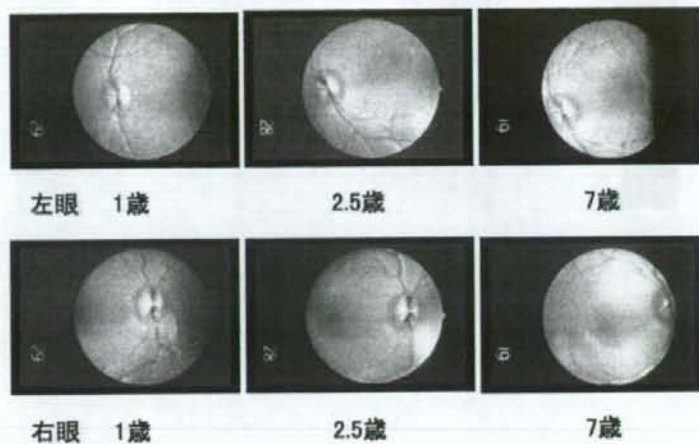


図2:1319907042の眼底変化(左眼拡大図)

