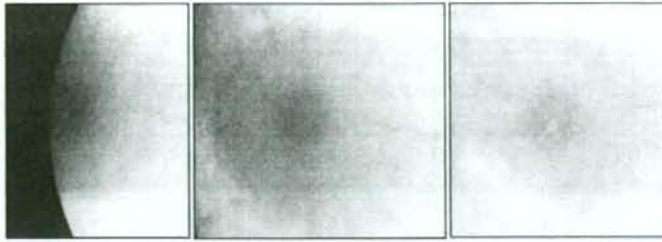


図3: 1319907042の眼底変化(右眼拡大図)



右眼 1歳

2.5歳

7歳

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	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	西村 俊秀	東京医科大学臨床プロテオームセンター	客員教授
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活性化抑制剤による薬効試験を行い、6ヶ月後の眼底観察では効果が現れていることを確認した。今回使用した、補体 C3 因子活性化抑制剤に引き続き、活性経路の直下に位置する補体 C5 因子をターゲットにした補体抑制薬を確保し、徐放剤に加工して8月から実験を開始する。このように、本事業では早期診断法とその予防・治療法の開発が同時に進行しており、これらの情報は総合的なデータベースに統合される予定である。

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ゲツ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を行った。C3及びC5抑制薬をそれぞれ1つ選択し、C3抑制薬は平成19年8月から実験を開始した。また、C5抑制薬に関しては分解しやすい性質のために、徐放剤に加工する作業が行われており、平成20年8月より実験を開始する。

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、マカカ属用の連鎖解析マーカーによって解析を行い、染色体4番長腕の先端に位置することが判明した。この領域には加齢黄斑変性に関係すると思われる遺伝子が3つ存在しており、これらのクローニング及び、塩基配列を解析中である。

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、DNA150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Affymetrix社のGeneChipの50万遺伝子多型（SNP）チップが用いて、感受性遺伝子を明らかにした（特許出願）。また、疾患によって血漿組成が変化すると予測されたため、東レ株式会社との共同研究によって、低分子血漿蛋白分離装置を開発し、加齢黄斑変性患者の血漿中に含まれる低分子の疾患バイオマーカーを発見した（特許出願）。

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り、研究計画に従って、順調に進行している。

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科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た。

三宅先生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、萎縮型の加齢黄斑変性動物モデルであることが明らかとなった。

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 (LPS)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の作製中である。自然発症個体に加え、補体抑制薬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。LPSによる補体活性化誘発モデルについてはラットで検討中である。

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、生分解性及びプラスチックの素材で作られた小型カプセル（球、筒状）を開発中である。補体抑制薬の性質に適合するかたちで開発が進められており、生体分解性素材では6-12ヶ月、プラスチックでは1-3年の薬効が期待される。補体の古典経路や2次経路を特異的に抑制する2種類の薬剤を検討している。疾患個体8頭に対し、平成19年8月より、毎週C3補体抑制薬の硝子体注入が開始された。徐放剤に加工されたC5補体抑制薬は平成20年8月より実施する。

3) 補体抑制薬による動物実験：

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)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した。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に対する抑制薬を開発し、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、霊長類モデルでのドルーゼン生成の抑制または消失が可能か世界的にも注目されている研究が進行中である。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、バイオロ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ドルーゼンが蓄積し、これを網膜色素上皮細胞が消化できないことが原因と考えられる。この遺伝子の発見はドルーゼンの生成経路の出発点を解明し、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。サル染色体4q末端と疾患との連鎖が観察されているが、この領域はヒト染色体6q末端に相当し、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によってクローニングして遺伝子解析を行う。

染色体6q以外についても連鎖解析を継続する(GeneMapper™ 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検体を目標に国立病院機構、順天堂大学医学部浦安病院眼科、杏林大学医学部アイセンターが参加して、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GeneChip 50万SNP(遺伝子多型)を用いてGenome Wide Association Studyが行われた。

(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、検討を行った。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った。遺伝子多型解析と血漿疾患バイオマーカーとの相関を解析中である。

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。三宅先生等が開発した局所ERG測定装置を使って、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。この結果、疾患サルは萎縮型の

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、視機能の障害に至ることが確認された。

2) 網膜へのドラッグデリバリー法の開発:

C3及びC5補体活性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るが、このためには徐放剤の開発が不可欠である。特にC5補体活性抑制薬は半減期が短いために、今回この抑制薬に適合する生体分解性の素材による徐放剤を新たに選別し、加工作業を行っている。徐放剤に封入されたC5補体活性抑制薬の疾患サルへの硝子体投与は平成20年8月から開始する。C3補体抑制薬は毎週100マイクログラムが硝子体投与されている。

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100 μ gに変更し、毎週硝子体投与が行われている。50 μ g硝子体投与の疾患個体4頭について半年が経過したが、疾患個体で投与前に監察されていた輪郭明瞭なドルーゼンが薄くばやけてきた。今後さらに6ヶ月の観察を行い、その前後の眼底観察によって最終的な薬効を判断する。同じ抑制薬はアメリカで第1相試験が開始されており、我々の実験は世界的に注目されている。

(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。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に投稿されている。我々はこれらの情報を基に染色体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。この領域には網膜、網膜色素上皮細胞で発現する遺伝子が3つ以上存在し、これらを現在解析中である。

(6) 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ー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ー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。今回我々は疾患2個体及び正常2個体から網膜色素上皮細胞の分離培養に成功し、カニクイザル専用のマイクロアレーによる遺伝子発現解析及び二次元電気泳動と質量分析計によるプロテオーム解析を行い、このデータを解析中である。

(7) 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検体を目標に国立病院機構、順天堂大学医学部浦安病院眼科、杏林大学医学部アイセンターが参加して、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。

また、エール大学のJ Hoh等との共同研究によってセリンプロテアーゼ11プロモーター領域の遺伝子多型(SNP)と日本人の滲出型加齢黄斑変性と強く相関することを明らかにした。我々が独自に行ったGenome Wide Association Study(GWAS)によってもこの相関は確認された。さらに今回のGWASでは新たに疾患と相関する領域を複数発見し、現在この領域の解析を行っている。これらの情報は加齢黄斑変性患者に共通の遺伝的体質を明らかにするものであり、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が行われたことになる。GWAS結果は特許として出願中である。

(8) 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た。東レ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が行われた。この結果、加齢黄斑変性の患者のみで検出されるタンパク質を複数発見した(特許出願)。現在これらのタンパク質について抗体を用いて、患者・健常者の血漿中での濃度及び霊長類の眼球切片による免疫染色法による解析を行っている。

D. 考察

本研究では血管新生をとまなう最も重篤な滲出型加齢黄斑変性の患者さんから血液検体を収集し、遺伝子多型解析及びプロテオーム解析を行った。その結果、加齢黄斑変性の感受性遺伝子の発見及び疾患バイオマーカーとしての血漿蛋白の探索に成功した。その一方で萎縮

型加齢黄斑変性霊長類モデルを利用した補体活性抑制薬の薬効試験を実施した。

今回使用したAffymetrix社のGeneChip 500Kは糖尿病、ガン、リュウマチなどの分野で大きな成果を上げており、我々の研究結果もこれまでの研究結果を支持しつつ、新たに複数の感受性遺伝子を釣り上げるようになった。これまで主に米国主導で行われてきたマイクロサテライトマーカーによる連鎖解析と異なって、大幅な解像度の向上によってピンポイントに遺伝子を特定することが可能になった。

最も上位を占めるSNPはp値が 1×10^{-10} を下回っており、データの信頼度がきわめて高い。加齢黄斑変性が多遺伝子疾患であると考えられることから、上位を占める遺伝子領域は相互に疾患の発症に関係していると予想される。来年度はこの関係を明らかにし、軽症で終息する患者と重症に進行する患者の区別が遺伝子レベルで可能か検討を行う。

眼科疾患の進行を判断するために眼球内部の体液を検査対象にすることは困難である。加齢黄斑変性は血液や免疫系と深く関係することから、患者の血液中の微量成分が変化すると予測してプロテオーム解析を行った結果、複数のタンパク質が患者で変化していることが明らかになった。疾患バイオマーカーとしてだけでなく、加齢黄斑変性の病理学的観点からも興味深い。

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。

疾患カニクイザルの原因遺伝子の同定はカニクイザル・ゲノムの情報不足によって遅い進行であったが、2007年にカニクイザルと同じマカカ属のアカゲザル(Rhesus Monkey)のゲノム解読がScience誌に発表され、連鎖解析マーカーも一挙にデータベース上に公開され、疾患原因遺伝子座が染色体4q先端に絞り込まれた。このScience誌では我々の仕事が紹介された。この領域には3つの候補となる遺伝子が存在し、ゲノム情報に基づいてクローニングを行っている。

ドルーゼンに補体活性化分子が発見され、欧米人の加齢黄斑変性の感受性遺伝子として補体H因子の関与が報告されてから、疾患と補体

との関係が注目されるようになった。補体の活性化は周辺網膜を障害することから、これを抑制することによって疾患の予防・治療の可能性を検討した。補体活性経路は古典経路、2次経路、そしてレクチン経路が存在するが、何れも補体C3因子で合流し、その直下にC5因子が存在する。C3及びC5因子に対する有効な抑制薬で毒性がきわめて少ないことが確認されている薬を用いて今回の実験が行われた。C3抑制薬であるコンブスタチンは2種類の濃度で硝子体投与が行われたが、50 μ gの低濃度でもその効果が現れている。平成20年度7月まで薬効試験を続行し、C3抑制による予防・治療法の有効性を判断する。また、徐放剤に加工中のC5抑制薬は8月より硝子体投与を行う予定である。

疾患2個体及び同年齢の正常2個体から培養された網膜色素上皮細胞はその性質が大きく異なることが明らかにされた。網膜色素上皮細胞への障害とドルーゼンが若年で蓄積することは直接的あるいは間接的に関係していると予想される。加齢黄斑変性の根幹につながる情報が得られる可能性があり、平成20年度は疾患個体から得られた網膜色素上皮細胞を詳細に解析する。

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

Yoshida T, Wan AD, 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.

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.

Hatano N, Mizota A, Tanaka M. Vitreous surgery for diabetic macular edema—its prognosis and correlation between preoperative systemic and ocular conditions and visual outcome. *Ann Ophthalmol (Skokie)*. 2007 Sep;39(3):222-7.

Nakajima H, Mizota A, Tanaka M. Technical note: method for estimating volume of subretinal fluid in cases of localized retinal detachment by OCT ophthalmoscopy. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2007 Sep;27(5):512-7.

Mizota A, Sakuma T, Miyauchi O, Honda M, Tanaka M. Measurement of retinal thickness from three-dimensional images obtained from C scan images from the optical coherence tomography ophthalmoscope. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007 Apr;35(3):220-4.

Ebihara N, Chen L, Tokura T, Ushio H, Iwatsu M, Murakami A. Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment

epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 2007;39(3):155-63.

Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tanuma R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *BMC Genomics.* 2008 Feb 24;9(1):90

Nakamura S, Okabayashi S, Ageyama N, Koie H, Sankai T, Ono F, Fujimoto K, Terao K. Transthyretin amyloidosis and two other aging-related amyloidoses in an aged vervet monkey. *Vet Pathol.* 2008 Jan;45(1):67-72.

Kimura N, Imamura O, Ono F, Terao K. Aging attenuates dynactin-dynein interaction: down-regulation of dynein causes accumulation of endogenous tau and amyloid precursor protein in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res.* 2007 Oct;85(13):2909-16.

Kikuchi T, Hara M, Terao K. Development of a microsatellite marker set applicable to genome-wide screening of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primates.* 2007 Apr;48(2):140-6.

Kondo M, Ueno S, Piao CH, Miyake Y, Terasaki H. Comparison of focal macular cone ERGs in complete-type congenital stationary night blindness and APB-treated monkeys. *Vision Res.* 2008 Jan;48(2):273-80.

Terauchi N, Fujinami K, Shinoda K, Tsunoda K, Hanazono G, Miyake Y, Inomata K. Transient macular dysfunction determined by focal macular electroretinogram. *Br J Ophthalmol.* 2007 Dec;91(12):1709-10.

Ikenoya K, Kondo M, Piao CH, Kachi S, Miyake Y, Terasaki H. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes of patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Jul;48(7):3312-7.

Hanazono G, Tsunoda K, Shinoda K, Tsubota K, Miyake Y, Tanifuji M. Intrinsic signal imaging in macaque retina reveals different types of flash-induced light reflectance changes of different origins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Jun;48(6):2903-12.

Yasukawa T, Wiedemann P, Hoffmann S, Kacza J, Eichler W, Wang YS, Nishiwaki A, Seeger J, Ogura Y. Glycooxidized particles mimic lipofuscin accumulation in aging eyes: a new age-related macular degeneration model in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007 Oct;45(10):1475-85.

2. 出版物

Takeshi Iwata. Complement Activation of Drusen in Primate Model (*Macaca fascicularis*) for Age-Related Macular Degeneration. *Innate Immunity, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Science + Business Media, LLC. (2008)

Takeshi Iwata and Stanislav Tomarev. *Animal Models for Eye Diseases and Therapeutics, Source Book of Biomedical Research*, Humana Press Inc. (2008)

岩田岳、網膜・硝子体のプロテオーム解析、日本の眼科 78:577-582 (2007)

3. 学会

(学会一般演題)

111 回日本眼科学会総会 (大阪, 2007) 岩田岳、渋谷昌彦、岡本はる、野沢壮宏、内海潤、Reddy Venkat、田中靖彦。トランスクリプトーム及び

プロテオームの比較による網膜色素上皮細胞増殖因子TFPI-2の機能解析

111回日本眼科学会総会(大阪, 2007) 吉田統彦, Andrew DeWan, 岡本はる, 皆見政好, 尾羽沢実, 溝田淳, 本田美樹, 斉藤義博, 高木郁江, フォジョセフィーン, 岩田岳。
加齢性黄斑変性症の危険因子としてのHTRA1プロモーター遺伝子多型の解析

Human Proteome Organization 6th Annual World Congress (Seoul, Korea 2007) H Okamoto, S Umeda, T Nozawa, MT Suzuki, K Terao, Y Yoshikawa, T Iwata. Comparative proteome analysis of macula versus peripheral retina in cynomolgus monkey.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (Fort Lauderdale, Florida, USA 2007) T Yoshida, K Fujinami, K Shinoda, Y Miyake, MT Suzuki, K Terao, Y Yoshikawa, T Iwata. Focal Macular Electroretinogram of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) with Early Onset Macular Degeneration.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (Fort Lauderdale, Florida, USA 2007) H Okamoto, S Umeda, T Nozawa, MT Suzuki, K Terao, Y Yoshikawa, Y Miyake, T Iwata. Comparative proteome analysis of macula versus peripheral retina in cynomolgus monkey.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (Fort Lauderdale, Florida, USA 2007) M Minami, T Iwata. Interaction of secreted MYOC and the cell surface protein on NIH3T3 cells.

Association for Research in Ophthalmology and Vision (Fort Lauderdale, Florida, USA 2007) M Akahori, N Inoue, M Obazawa, M Minami, H Okamoto, Y Miyake, T Iwata. Identification of Glaucoma Associated SNPs using SNP Microarray.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1 特許

(加齢黄斑変性患者の血漿プロテオーム)

特願2008-092245

特願2008-091522

特願2008-092021

(遺伝子多型解析)

出願中

2 実用新案登録 なし

3 その他 なし

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	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分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 500K Array Set を用いて50万種類の遺伝子多型が解析され、全ゲノム関連解析 (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相関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で、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、健康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の発現が健康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、細胞の食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 $50\mu\text{g}$ 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 $50\mu\text{g}$ に変更した。投与量の $50\mu\text{g}$ 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 DNA 250 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 200 DNA 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か検討した。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科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MHC I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 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. PROTEOME 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.

Sensory Organs Society for Neuroscience
2008,

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

The American Society for Cell Biology 48th
Annual Meeting, (USA, San Francisco, 2008)
2008, 12 Takeshi. Iwata, Zai-Long. Chi, Fumie.
yasumoto, Masakazu. Akahori, Minoru. Obazawa
, Itaru Kimura, Naoki. Nakaya,
and Stanislav. Tomarev.
Overexpression of Mutated Optineurin and
WDR36 Leads to Normal Tension Glaucoma in
Mice.

岩田岳 特願 2008-267716
緑内障のリスクの予測方法

岩田岳 特願 2008-272161
滲出型加齢黄斑変性のリスクの予測方法

(著者・題名・発表誌名・巻・頁・発行年等
も記入)

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

岩田岳 特願 2008-091522
神経障害の検定のための組成物、キットおよび方法

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

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

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

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

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

岩田岳 特願 2008-241209
トランスジェニック動物

II. 研究成果の刊行物・別刷

我が国の先端的眼科研究の現場から
失明を防ぐための多面的なアプローチ

岩 田 岳

我が国の先端的眼科研究の現場から 失明を防ぐための多面的なアプローチ

岩田 岳



ヒトが受信する情報の8割は視覚情報が占めると考えられており、眼は感覚器官の中でもとくに重要である。視覚障害は生活の質に著しく影響し、社会的・経済的にも大きな負担を強いる。世界中で失明予防の研究が盛んに行われているが、今回はとくに研究成果が著しい加齢黄斑変性と緑内障について筆者らの研究を中心に紹介したい。

キーワード：眼、加齢黄斑変性、緑内障、予防医学、疾患動物モデル

はじめに

ヒトは情報の8割を視覚に依存すると考えられており、眼は最も重要な感覚器官である。視覚障害は生活の質に著しく影響し、社会的・経済的にも大きな影響を及ぼす。世界保健機構(World Health Organization, <http://www.who.int/en/>)によると、2002年には世界中で1億6100万人の視覚障害者が存在したと報告されており、そのうち1億2400万人が中度の視覚障害、3700万人が失明していたと推定している。視覚障害となる原因については外傷、感染、糖尿病などがあるが、人種や経済状態によって各国で異なっている。疾患別に世界的規模で見ると、670万人が白内障(Cataract)、緑内障(Glaucoma)および加齢黄斑変性(AMD)によって失明しており、その他に角膜白濁(Corneal opacities)、糖尿病網膜症(Diabetic retinopathy)などが続く(図1)。先進国においては白内障手術の目覚ましい進歩によって失明率が急激に低下しており、日本では緑内障が最も多いのに対して、アメリカやヨーロッパでは白人を中心に加齢性黄斑変性の患者が多い。緑内障や加

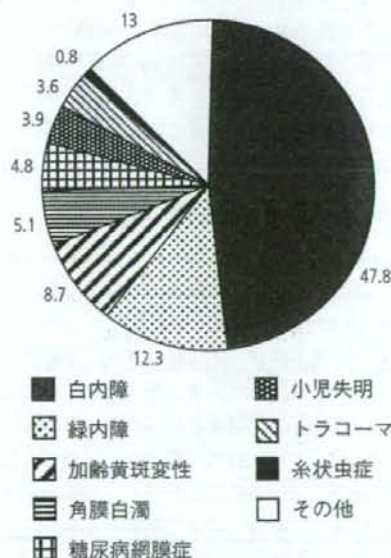


図1 世界の視覚障害の割合 (世界保健機構 2002)

Current progress of eye research

筆者紹介：いわた・たけし(IWATA, Takeshi) (独)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)視覚研究部門 細胞・分子生物学研究室(Natl. Hospital Organization Tokyo Med. Cent. Natl. Inst. of Sensory Organs Div. of Vision Res. Lab. of Cellular & Molecular Biol.) 細胞・分子生物学研究室長 農学博士 専門：細胞分子生物学 連絡先：〒152-8902 東京都目黒区東ヶ丘2-5-1 E-mail iwatatakeshi@kankakuki.go.jp (勤務先)

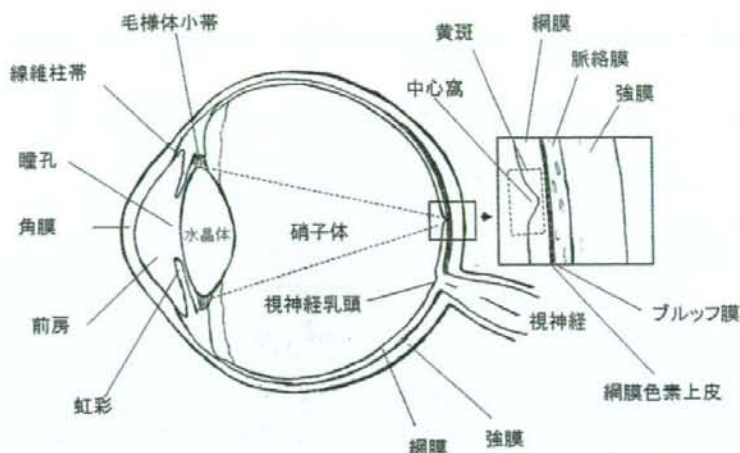


図2 眼の基本構造

加齢黄斑変性は遺伝、環境そして生活習慣がリスク因子となつて発症すると考えられている。加齢黄斑変性や緑内障の発症によって網膜での細胞死が起こると、これを移植によって補ったり、神経細胞を増殖させたりすることが困難であるため、国内外で視神経の再生医療や人工網膜の開発が行われている。筆者らは病気に至る前の段階でこれを察知し、患者予備軍を選別し、発症する前に予防法によって食い止める、「予防医学」の観点からこれまで研究を行ってきた。

1. 眼の基本構造と検体収集の難しさ

眼は組織学的に高度に分化しており、角膜や水晶体からなる前眼部と網膜、視神経からなる後眼部から構成されている(図2)。角膜および水晶体で収束した光は黄斑を中心に像を結び、光情報は電気信号に変換されて脳に伝えられる。このいずれの過程においても障害が発生した場合には視覚障害につながる可能性がある。眼研究の難しさは、病気の患者から組織の一部を切り出し、研究に利用することが極めて困難なことである。また法律上、死者の眼球を実験に利用することも、アメリカとは異なって、日本では禁じられている。予防医学的観点からも、早期診断に利用できる検体が涙液、血液、尿に限られるために、必然的に研究対象は白血球から抽出されるDNAを用いた遺伝子解析と血漿プロテオーム解析に落ち着くことになる。白内障や網膜疾患の手術中に捨てられる房水、硝子体の一部

については、患者の同意を得れば倫理的に研究対象として承認されている。

2. 感覚器ネットワーク構築による症例情報収集システムとDNA・血漿バンクの設立

2004年、国立病院機構および厚生労働省の支援を受けて、オンラインによる症例情報の収集とDNA・血漿バンクの設立を目的とした「感覚器ネットワーク」を感覚器センターに構築した(図3)。関連施設の国立病院および大学病院から緑内障と加齢黄斑変性の症例情報をウェブ画面上から登録し、同時に血液検体を発送する仕組みである。症例情報には個人情報を除く患者の臨床所見が詳細に登録できるようになっており、眼底写真の添付も可能である。遺伝子およびプロテオミクスの解析結果は症例情報と一体化され、個々の患者について総合的なデータベースが構築されることにより、眼科分野におけるテーラーメイド医療の可能性を模索する。インターネットを介した症例情報の送受信に対しては計画当初より倫理的観点からの反対意見もあったが、認証技術と暗号化技術の進歩によって信頼できるシステムが構築されている。

3. ハプロタイプを利用した加齢黄斑変性のリスク遺伝子の探索

加齢黄斑変性は黄斑周辺において網膜色素上皮細胞とブルッフ膜の間にドルーゼン(網膜下に蓄積する