

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 factors play a 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 a 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, Noureddine, 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  $<50 \mu\text{m}$  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,  $\alpha_1$ -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

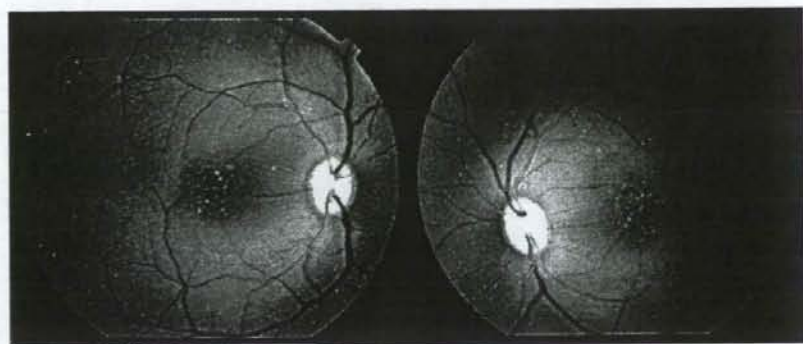
in drusen. The presence of immunoreactive proteins and the oxidative modifications of many proteins in drusen imply that both oxidation and immune functions are involved in the pathogenesis of AMD. These findings suggest that complement activation triggers innate immune responses in the subretinal space. 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 affect and 210 unaffected monkeys. Drusen were observed in the



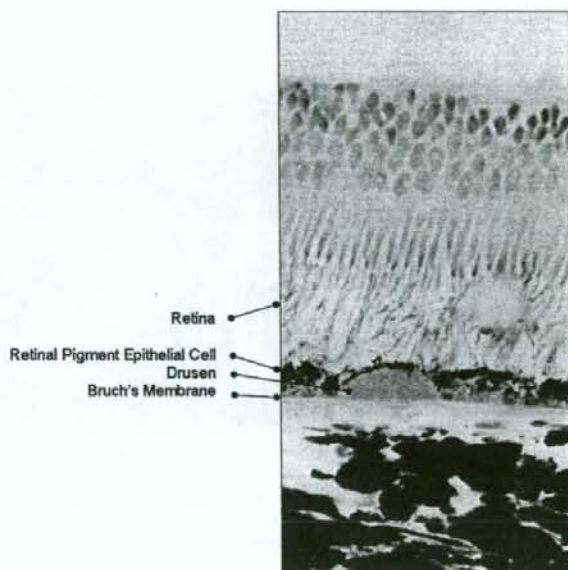
macular region as early as one year after birth, and the numbers increased and spread toward the peripheral retina throughout life. No histological abnormalities have been found in the retina, retinal vessels, or choroidal vasculatures of the eyes with drusen. However, abnormality in electroretinogram (ERG) were observed in sever case showing dysfunction of the macula.



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

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



**Figure 2.** Retinal histological section of affected Suzuki Monkey showing the accumulation of drusen between the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane.

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,  $\alpha$ 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.

The eyes of monkey are structurally similar to human eyes which make them extremely valuable for AMD studies. However, there are limitations in using this species over other laboratory animals. Monkeys have a relatively longer life span, have a longer gestation period, have a lower birth numbers resulting in a slower expansion of the pedigree, more difficult to genetically manipulate, and the maintenance cost is high. In the other laboratory animals, the differences in the eye structure, lack of a fovea, and a low cone/rod ratio compared to humans have been considered to be a disadvantage for using them as AMD models. However, they are easier to manipulate genetically and easier and less expensive to maintain. This has made the development of a mouse model of AMD very attractive, and a number of mouse AMD models have been reported recently.

## **6. MOUSE MODEL FOR AMD**

The mouse model described by Ambati et al is deficient either in monocyte chemoattractant protein-1 or its cognate C-C chemokine receptor-2. These mice were

found to develop the cardinal features of AMD including accumulation of lipofuscin in drusen beneath the RPE, photoreceptor atrophy, and CNV (Ambati et al. 2003). An impairment of macrophage recruitment allowed the accumulation of C5a and IgG, which leads to the production of vascular endothelial growth factor by the RPE cells and the development of CNVs. Another mouse model that has three known AMD risk factors: age, high fat cholesterol rich diet, and expression of human apolipoprotein E (apoE2, apoE3, apoE4) has been developed (Malek, Johnson, Mace, Saloupis, Schmechel, Rickman, Toth, Sullivan, and Bowes Rickman 2005). ApoE4-deficient mice are severely affected showing diffuse subretinal pigment epithelial deposits, drusen, thickened Bruch's membrane, and atrophy, hypopigmentation, and hyperpigmentation of the RPE.

Oxidative stress has long been linked to the pathogenesis of AMD. Imamura et al reported a Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1)-deficient mice that had features typical of AMD in human. Senescent Sod1 (-/-) mice had drusen, thickened Bruch's membrane, and choroidal neovascularization (Imamura, Noda, Hashizume, Shinoda, Yamaguchi, Uchiyama, Shimizu, Mizushima, Shirasawa, and Tsubota 2006). The number of drusen increased with age and also after exposure of young Sod1 (-/-) mice to excess light. The retinal pigment epithelial cells of Sod1 (-/-) mice showed oxidative damage, and their beta-catenin-mediated cellular integrity was disrupted. These findings suggested that oxidative stress may affect the junctional proteins necessary for the barrier integrity of the RPE. These observations strongly suggested that oxidative stress may play a major role in AMD.

The complement components, C3a and C5a, are present in drusen, and were observed in Bruch's membrane of a laser-induced CNV mice model. Neutralization of C3a or C5a by antibody or by blockade of their receptors by a complement inhibitor significantly reduced the CNV (Nozaki, Raisler, Sakurai, Sarma, Barnum, Lambris, Chen, Zhang, Ambati, Baffi, and Ambati 2006). These observations revealed a role for immunological mechanisms for the angiogenesis and provided evidence for future



therapeutic strategies for AMD. Although the pathology of AMD is pronounced in the macula area, it is not confined to this region. Characteristics of human AMD such as thickening of Bruch's membrane, accumulation of drusen, and CNV have been observed in mouse models. Nevertheless, the primate model will still be the choice for AMD studies, especially at the stage when new therapeutic methods are tested and evaluated for the first time. However, it would be wise and more productive to study both primate and mouse models in AMD research. This will be necessary to learn the mechanisms underlying the disease and to identify clinical and molecular markers for the early stages of AMD. The findings from these studies will provide critical information needed to develop therapies for AMD.

#### **7. ACKNOWLEDGEMENT**

This work was supported by the research grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

## 8. REFERENCES

- Ambati, J., Anand, A., Fernandez, S., Sakurai, E., Lynn, B. C., Kuziel, W. A., Rollins, B. J., Ambati, B. K. (2003) An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat. Med.* 9,1390-1397.
- Chader, G. J. (2002) Animal models in research on retinal degenerations: Past progress and future hope. *Vision Res* 42,393-399.
- Dewan A., Liu, M., Hartman, S., Zhang, S. S., Liu, D. T., Zhao, C., Tam, P. O., Chan, W. M., Lam, D. S., Snyder, M., Barnstable, C., Pang, C. P., Hoh, J. (2006) HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 314,989-992.
- Edwards, A. O., Ritter, R. 3rd., Abel, K. J., Manning, A., Panhuysen, C., Farrer, L. A. (2005) Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308,421-424.
- El-Mofty A., Gouras, P., Eisner, G., Balazs, E. A. (1978) Macular degeneration in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Exp. Eye Res.* 27,499-502.
- Gold, B., Merriam, J. E., Zernant, J., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Gehrs, K., Cramer, K., Neel, J., Bergeron, J., Barile, G. R., Smith, R. T. (2006) AMD Genetics Clinical Study Group; G. S. Hageman, M. Dean, R. Allikmets. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 38,458-462.
- Gotoh, N., Yamada, R., Hiratani, H., Renault, V., Kuroiwa, S., Monet, M., Toyoda, S., Chida, S., Mandai, M., Otani, A., Yoshimura, N., Matsuda, F. (2006) No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese. *Hum. Genet.* 120,139-143.

Hageman, G. S., Anderson, D. H., Johnson, L. V., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Hardisty, L. I., Hageman, J. L., Stockman, H. A., Borchardt, J. D., Gehrs, K. M., Smith, R. J., Silvestri, G., Russell, S. R., Klaver, C. C., Barbazetto, I., Chang, S., Yannuzzi, L. A., Barile, G. R., Merriam, J. C., Smith, R. T., Olsh, A. K., Bergeron, J., Zernant, J., Merriam, J. E., Gold, B., Dean, M., Allikmets, R. (2005) A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102,7227-7232.

Haines, J. L., Hauser, M. A., Schmidt, S., Scott, W. K., Olson, L. M., Gallins, P., Spencer, K. L., Kwan, S. Y., Nouredine, M., Gilbert, J. R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E. A., Pericak-Vance, M. A. (2005) Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308,419-421.

Hammond, C. J., Webster, A. R., Snieder, H., Bird, A. C., Gilbert, C. E., Spector, T. D. (2002) Genetic influence on early age-related maculopathy: A twin study. *Ophthalmology* 109,730-736.

Heiba, I. M., Elston, R. C., Klein, B. E., Klein, R. (1994) Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: The Beaver Dam Eye Study. *Genet. Epidemiol.* 11,51-67.

Imamura, Y., Noda, S., Hashizume, K., Shinoda, K., Yamaguchi, M., Uchiyama, S., Shimizu, T., Mizushima, Y., Shirasawa, T., Tsubota, K. (2006) Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103,11282-11287.

Iyengar, S. K., Song, D., Klein, B. E., Klein, R., Schick, J. H., Humphrey, J., Millard, C., Liptak, R., Russo, K., Jun, G., Lee, K. E., Fijal, B., Elston, R. C. (2004) Dissection of genomewide-scan data in extended families reveals a major locus and oligogenic susceptibility for age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 74,20-39.

Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J. Y., Sackler, R. S., Haynes, C., Henning, A. K., SanGiovanni, J. P., Mane, S. M., Mayne, S. T., Bracken, M. B., Ferris, F. L., Ott, J., Barnstable, C., Hoh, J. (2005) Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308,385-389.

Schick, J. H., Iyengar, S. K., Klein, B. E., Klein, R., Reading, K., Liptak, R., Millard, C., Lee, K. E., Tomany, S. C., Moore, E. L., Fijal, B. A., Elston, R. C. (2003) A whole-genome screen of a quantitative trait of age-related maculopathy in sibships from the Beaver Dam Eye Study. *Am. J. Hum. Genet.* 72,1412-1424.

Majewski, J., Schultz, D. W., Weleber, R. G., Schain, M. B., Edwards, A. O., Matise, T. C., Acott, T. S., Ott, J., Klein, M. L. (2003) Age-related macular degeneration--a genome scan in extended families. *Am. J. Hum. Genet.* 73,540-550.

Malek, G., Johnson, L. V., Mace, B. E., Saloupis, P., Schmechel, D. E., Rickman, D. W., Toth, C. A., Sullivan, P. M., Bowes Rickman, C. (2005) Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: a model for age-related retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102,11900-11905.

Mullins, R. F., Russell, S. R., Anderson, D. H., Hageman, G. S. (2000) Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 14,835-846.

Nicolas, M. G., Fujiki, K., Murayama, K., Suzuki, M. T., Mineki, R., Hayakawa, M., Yoshikawa, Y., Cho, F., Kanai, A. (1996) Studies on the mechanism of early onset macular degeneration in cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys. I. Abnormal concentrations of two proteins in the retina. *Exp. Eye Res.* 62,211-219.

Nicolas, M. G., Fujiki, K., Murayama, K., Suzuki, M. T., Shindo, N., Hotta, Y., Iwata, F., Fujimura, T., Yoshikawa, Y., Cho, F., Kanai, A. (1996) A. Studies on the mechanism of early onset macular degeneration in cynomolgus monkeys. II. Suppression of metallothionein synthesis in the retina in oxidative stress. *Exp. Eye Res.*



62,399-408.

Nozaki, M., Raisler, B. J., Sakurai, E., Sarma, J. V., Barnum, S. R., Lambris, J. D., Chen, Y., Zhang, K., Ambati, B. K., Baffi, J. Z., Ambati J. (2006) Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103,2328-2333.

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., Iwata, T. (2006) Complement factor H polymorphisms in Japanese population with age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 12,156-158.

Russell, S. R., Mullins, R. F., Schneider, B. L., Hageman, G. S. (2000) Location, substructure, and composition of basal laminar drusen compared with drusen associated with aging and age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 129,205-214.

Seddon, J. M., Ajani, U. A., Mitchell, B. D. (1997) Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am. J. Ophthalmology* 123,199-206.

Stafford, T. J., Anness, S. H., Fine, B. S. (1984) Spontaneous degenerative maculopathy in the monkey. *Ophthalmology* 91,513-521.

Yang, Z., Camp, N. J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D. J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., Chien, J., Dewan, A., Harmon, J., Bernstein, P. S., Shridhar, V., Zabriskie, N. A., Hoh, J., Howes, K., Zhang, K. (2006) A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*, 314,992-993.

Umeda, S., Ayyagari, R., Allikmets, R., Suzuki, M. T., Karoukis, A. J., Ambasudhan, R., Zernant, J., Okamoto, H., Ono, F., Terao, K., Mizota, A., Yoshikawa, Y., Tanaka, Y., Iwata, T. (2005) Early-onset macular degeneration

with drusen in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree: exclusion of 13 candidate genes and loci. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46,683-691.

Umeda, S., Suzuki, M. T., Okamoto, H., Ono, F., Mizota, A., Terao, K., Yoshikawa, Y., Tanaka, Y., Iwata, T. (2005) Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J.* 19,1683-1685.

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）  
視覚研究部門  
細胞・分子生物学研究室  
研究室長  
岩田 岳（いわた たけし）

## 網膜・硝子体のプロテオーム解析

### 1) はじめに

ヒトゲノムプロジェクトが終了し、約 2 万 3 千個の遺伝子が発見された。この遺伝子から転写される RNA（トランスクリプトーム）から 10 万種類以上のタンパク質が生成されると予測されている（図 1）。近年、タンパク質のイオン化技術や質量分析計の精度が向上し、さらにそれを制御・解析するソフトウェアの改良によって、質量分析計の専門技術者でなくても細胞、組織、体液などのタンパク質（プロテオーム）を網羅的に測定し、データを解析することがある程度可能になってきた。健常と病気のプロテオームを比較し、その違いを明らかにすることは、疾患の発症機序を解明するための手がかりとなる情報をもたらすだけでなく、疾患バイオマーカーとして早期診断法の確立にも応用が期待される。硝子体プロテオームは疾患網膜の状態を反映してダイナミックに変化していると考えられる。また、網膜疾患には脈絡膜毛細血管と深い関わりのあるものがあり、網膜成分の血管への漏出による血漿成分の変化として捉えられることが期待されている。本編ではここ数年間の質量分析計を用いた網膜・硝子体の網羅的タンパク質解析に焦点を絞り、その利用方法と臨床応用への可能性について紹介したい。

### 2) 硝子体のプロテオーム

硝子体は眼球内で最も体積を占める透明なゼリー状の組織であり、網膜と接しているために網膜疾患によってその組成は大きく変化していると考えられる。硝子体、房水、血漿の蛋白量をそろえて 1 次元電気泳動を行うと見分けがつかないほど泳動パターンは類似している（図 2）。これは房水も硝子体も血漿由来の体液であり、血漿を構成する蛋白が硝子体や房水にも多く含まれていることを意味している。これまで我々が扱った房水や硝子体検体の蛋白濃度は出血の有無などによって 0.1-1.0mg/ml であるのに対し、血漿は 50-70mg/ml と 50 倍以上の蛋白濃度が測定されている。高蛋白濃度の血漿はプロテオミクス（プロテオーム研究）の分野で最も解析が先行しており、1 万種類のタンパク質がすでに同定されている。血漿は 2 2 種類の蛋白が 99% を占めており、微量蛋白は残り 1% に含まれている（図 3）。質量分析計の性質上、高い濃度で存在する蛋白から検出されるので、血漿を無分画のまま測定するとアルブミン、免疫グロブリン、トランスフェリンなどが検出され、微量タンパク質は検出されにくい。この数年間に 2 2 種類の蛋白を除去するための前処理技術として、各々



ンパク質に特異的な抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーカラムなどが開発されている。22のタンパク質が何れも50kDa以上の蛋白であることから、我々は東レ株式会社が開発中の中空繊維（ホロファイバー）を用いた低分子分画装置を利用して、低分子量領域に絞って、微量成分の分画を試みている（図4）。硝子体プロテオームは血漿プロテオームで蓄積されたノウハウを応用して微量タンパク質の同定が今後盛んに行われると予想される。

日本は硝子体プロテオームでこれまで世界をリードしており、これまでに報告された4つのバイオニ的な硝子体プロテオーム研究をご紹介します。2002年、中西等は糖尿病網膜症（3検体）と黄斑円孔（2検体）の患者の硝子体それぞれ2次元電気泳動で分画し、質量分析計（MALDI-TOF-MS、ESI-MS/MS）で分析した結果、50種類の蛋白を同定し、この内の30は血漿には含まれていないことを明らかにした。IgG、 $\alpha$ -antitrypsin、 $\alpha$ -2-HS glycoprotein、complement C4断片が糖尿病の硝子体で増加していることを報告している（文献1）。2003年小山等は糖尿病網膜症患者の硝子体を1次元電気泳動で分画し、質量分析計（ESI-IT-MS/MS）で分析した結果、84種類の蛋白の同定に成功し、前年に行った2次元電気泳動と合わせて121種類のタンパク質の同定に成功している。4種類の血管促進因子と3種類の抑制因子、PEDF、endostatin、thrombospondinが検出されている（文献2）。また同年、山根等は黄斑円孔（26検体）の硝子体を2次元電気泳動で分画し、400スポットを確認、78を同定している。同定されたペプチドは18の蛋白に由来しており、この中にはPEDF、prostaglandin-D2 synthase、IRBPが含まれていた。増殖性糖尿病網膜症（33検体）も同様に解析した結果、600スポットを確認し、121を同定した結果、38の蛋白が同定された。EnolaseとCatalaseが糖尿病の硝子体で顕著に増加しており、黄斑円孔の硝子体や糖尿病の血清中には検出されなかった（文献3）。2005年には大内等によって、増殖性糖尿病初期（Pre-proliferative）で黄斑浮腫の有無（16：4検体）の硝子体を2次元電気泳動で分画し、質量分析計（ESI-LC-MS/MS、QTOF）で分析した結果、DMEのグループから14種類の蛋白、non-DMEのグループから15種類の蛋白を同定した。特に8スポットは顕著にDMEグループで増加しており、そのうちの6つのスポットはPEDF、ApoA-4、Trip-11、RPBP、VDBPと同定された（文献4）。

硝子体サンプルは手術中に破棄されるものを倫理委員会の承認と文書による本人の了解を得て集められているが、検体の多くは病態末期のものが多く、これらの検体を解析しても疾患初期の硝子体内の様子を知ることができない。また、日本では正常な眼球の硝子体を集めることができないために、ベースとなるデータが不足しており、霊長類の硝子体プロテオーム解析を検討している。

### 3) 網膜疾患の早期発見のための血漿バイオマーカーの探索

近年、全ゲノム配列が解読された結果、ゲノム上には平均で1,000塩基に1つの割合で異なる配列が存在することが明らかになった。この遺伝子多型（SNP: Single Nucleotide Polymorphism）の生理作用への影響についてはまだ明らかにされていないが、その利用方法については注目されている。ゲノム上の1つのSNPあるいは隣接する複数のSNPを組み合わせてブロックにし、これを疾患とリンクさせる試みである。同染色体に位置する



SNP の組み合わせをハプロタイプと呼ぶが、全てのハプロタイプを明らかにするために国際ハップマッププロジェクト (<http://www.hapmap.org/>) が進行中である。3 x 10<sup>9</sup> 塩基から構成されるゲノム上には 1 千万個の SNP が存在すると計算されるが、これだけの SNP 数を安価に効率よく解析することは技術的に困難であった。しかし、最近、シリコンベースの DNA チップによって数十万個の SNP を同時に検出できるようになってきた。この方法によって、すでに加齢黄斑変性の 2 つのリスク遺伝子 (CFH, HtrA1) が同定されており、発症前にリスクの高い人を選別することが可能になってきた。しかし遺伝子情報からだけでは発症の時期まで予測することは困難であり、発症前の蛋白の量的・質的变化を捉えて発症を予測する方法が検討されている。発症前に健常者の硝子体を検査目的で採取することはきわめて困難であり、これを血漿や尿で代行できるか研究されている。網膜・脈絡膜から漏れた蛋白が全身への循環によって希釈されることになり、この微量な変化を検出する精度が求められる。

我々は東京医科大学の西村俊秀客員教授との共同研究によって血漿蛋白の微量変化を質量分析計によって検出されるか研究している。年齢 65 - 88 歳の加齢黄斑変性患者 6 名と白内障患者 6 名の血液を採血後 3 分以内に遠心分離によって得た血漿を用いている。血漿からアルブミンと免疫グロブリンを分離して、これを 1 次元電気泳動でさらに分画しても 2 疾患の泳動パターンに差は観察されないが (図 5)、質量分析のマスキロマトグラムとマススペクトルを擬似的な 2 次元表示にすると微量蛋白の変化が観察されるようになった (図 6)。我々は同様な研究を続け、発症前後の血漿サンプルによって疾患バイオマーカーの存在を検証したいと考えている。

#### 4) 質量分析計を用いたドルーゼンのプロテオーム

加齢黄斑変性で観察されるドルーゼンと萎縮型や滲出型へと分岐するメカニズムは不明であるが、最近の研究によってドルーゼンの構成蛋白が明らかになり、疾患と補体との関係が目ざされている。Hageman や Anderson 等は糸球体腎炎の患者で眼底所見によってドルーゼンが観察されることから、糸球体の炎症に関わる補体の活性化が網膜下でも起こっていると推測し、免疫染色法によってこれを証明している (文献 5, 6, 7)。さらに、Hollyfield 等もドルーゼンを抽出して、質量分析計によって蛋白組成を解析した結果、補体活性分子の存在を確認した (文献 8)。ドルーゼン内で発見された蛋白にはアミロイド β 関連分子や酸化ストレス関連分子など、補体活性化の原因になりうる蛋白が確認されている。

ヒトと同様に黄斑が発達している霊長類において、1970 年代から加齢黄斑変性モデルの探索が行われてきた。独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医学科学研究センターにおいて生後 2 年でドルーゼンを発症するカニクイザルが社団法人予防衛生協会の鈴木通弘等によって発見され (文献 9)、1 頭の疾患個体から交配実験によって大家系に繁殖することに成功した (図 7)。我々は厚生労働科学研究難治性疾患克服研究事業として研究班を組織して、ヒトと同様な方法によって疾患個体のドルーゼンを抽出し、プロテオーム解析と免疫染色法によって蛋白組成を解析した。その結果、補体活性分子、抑制分子、クリスタリンなど、ヒトに類似する蛋白組成が含まれることを明らかにした。疾患サルはヒトが 50 年以上かけて蓄積



するドルーゼンと同成分のドルーゼンをわずか2年で生成していることになる。疾患は家系内で優性遺伝することから、単一遺伝子の変異によって発症していると考えられ、この原因遺伝子の同定はドルーゼン生成のメカニズムに関わる重要な情報をもたらすと期待している。

#### 5) 黄斑のプロテオーム

霊長類と一部の鳥類などで発達している黄斑は視力を決定する重要な部位である。黄斑は錐体細胞が高密度に存在し、周辺網膜に比べて特徴ある構造をしていることから黄斑と周辺との生理的な差を分子レベルで解明するために、転写産物 (RNA) の解析が行われ、黄斑特異的な遺伝子も報告されている。この研究の延長線上には黄斑の蛋白解析が考えられるが、今日まで報告されていない。その理由には 1) 一般的な実験動物であるマウスやラットには黄斑が存在しないこと、2) 黄斑部組織が微量であること、3) 新鮮な黄斑を大量に手に入れることが困難であることなどが考えられる。我々は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において研究目的に安楽死された13-19歳の正常なオスザル8頭から黄斑部と網膜周辺部を3mm径の円柱でくり抜き、これを16眼球について採取し、黄斑と周辺網膜の蛋白抽出液を準備した。これを2次元電気泳動によって分画し、黄斑と周辺網膜の泳動パターンから、それぞれに特異的なスポットを複数発見した(図8)。これらのスポットをゲルからくり抜き、トリプシン処理によってペプチドに分解した後に、質量分析計(LC-MS/MS)を用いて解析した結果、これまで発見されなかった複数の蛋白が同定されてきた。黄斑疾患とこれらのタンパク質との関係については研究が続けられている。

#### 6) 網膜・硝子体プロテオーム解析の今後の課題

日進月歩の質量分析計の技術革新はこれまで不可能であった蛋白の網羅的解析を可能にし、電気泳動で分画されたスポットを容易に同定できるようになった。眼科分野でもヒトの硝子体、房水、涙液の網羅的プロテオーム解析、トランスジェニックやノックアウトマウスの眼組織のプロテオーム解析などが行われている。また、最新機器と解析ソフトを利用するとリン酸化、糖、脂質の修飾を受けた蛋白の同定や修飾されたアミノ酸の特定も可能になった。我々は黄斑に特異的な蛋白を探索する過程で、リン酸化蛋白の量的変化を観察している。蛋白修飾の生理的な意味や疾患との関係は今後明らかにされていくと期待される。このような網羅的修飾蛋白の解析はプロテオミクスによって初めて可能になった技術である。

質量分析計にも克服されなければならない弱点が存在する。その一つに質量分析計には定量性の精度が欠けることである。サンプル間に含まれる特定の蛋白について量的変化を高い精度で測定することができない。これまでは電気泳動後のバンドやスポットの濃さとして測定されたり、比較するサンプルを異なる同位体元素でそれぞれラベルして、質量分析計によってラベル化されたペプチドの検出回数として測定されたりする方法が行われてきた。同定した蛋白の定量性について今後の技術開発が望まれている。

これまで利用されてきたDNAチップを使った網羅的なトランスクリプトーム解析に加え、これにプロテオーム解析を組み合わせることによって、解析する領域を遺伝子発現から蛋白発現までに広げることが可能になった。DNAチップによって23,000遺伝子の変

化を観察し、同時に蛋白の有無を観察することができる。我々も同様な方法によって網膜色素上皮細胞を特異的に増殖させる因子 (REF-1/TFPI-2) の作用機序を研究している (文献 10)。この研究では発現量に変化が観察された蛋白間の関係を裏付けるデータとし、遺伝子発現データから推測される遺伝子発現の連鎖反応マップを利用した。今後はここへ蛋白修飾のデータも加わり、フェノミックスの世界へ一歩一歩近づくことになると期待される。

## 文献

- 1) Nakanishi T, et al. Catalogue of soluble proteins in the human vitreous humor: comparison between diabetic retinopathy and macular hole. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;776(1):89-100.
- 2) Koyama R, et al. Catalogue of soluble proteins in human vitreous humor by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry including seven angiogenesis-regulating factors. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;792(1):5-21.
- 3) Yamane K, et al. Proteome analysis of human vitreous proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2(11):1177-1187.
- 4) Ouchi M, et al. Proteomic analysis of vitreous from diabetic macular edema. *Exp Eye Res.* 2005;81(2):176-182.
- 5) Hageman GS, et al. Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. *FASEB J.* 1999;13:477-484.
- 6) Mullins RF, et al. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J.* 2000;14:835-846.
- 7) Crabb JW, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:14682-14687.
- 8) Umeda S, et al. Early-onset macular degeneration with drusen in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree: exclusion of 13 candidate genes and loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:683-691.
- 9) Umeda S, et al. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J.* 2005;19:1683-1685.