

## 27. 健診受診者における加齢黄斑変性関連 *HTRA1* 遺伝子多型と

### 血清 C-反応性タンパク濃度の関係

安間哲宏、中村 誠、西口康二、菊地雅人、濱島信之、丹羽利光、寺崎浩子  
(名古屋大)

**研究要旨** 健康診断受診者で、加齢黄斑変性(AMD)の関連遺伝子である *HTRA1* 遺伝子多型と AMD のバイオマーカーである血清 C-反応性タンパク濃度(CRP)の関係を検討した。60歳以上では、AMD 発症リスクの大きい *HTRA1* 遺伝子型を持つもので CRP が高かった。また、リスク遺伝子を持つものでは CRP の年齢変化が大きかった。AMD の遺伝的因子と AMD に関わるバイオマーカーとの関連を示唆している可能性がある。

#### A. 研究目的

加齢黄斑変性(以下、AMD)は、日本を含めた先進国では高齢者の主要な失明原因である。AMDは環境的要因と遺伝的要因から発症することが知られている。環境要因としては、加齢、喫煙歴、肥満、高血圧などが挙げられており、発症には酸化ストレスや慢性炎症が関与していると考えられている。多く検討されているのはバイオマーカーに C-反応性タンパク(以下、CRP)があり、AMDの発症や増悪に関係しているとされている。<sup>1,2)</sup> 一方の遺伝的要因も多く報告されているが、最も関与が大きいとされているのは、1番染色体の *CFH* 遺伝子多型<sup>3)</sup>と10番染色体上の *ARMS2/HTRA1* 遺伝子多型<sup>4,5)</sup>である。*CFH* 遺伝子多型は日本人での保有率が低いと、日本人での疾患への寄与はそれほど大きくないとされている。一方、10番染色体の多型は、連鎖不均衡ブロック内に *ARMS2* 遺伝子と *HTRA1* 遺伝子プロモータが含まれ、AMD と関連する多型の候補は、*ARMS2* のアミノ酸変異多型(rs10490924)と 3'非翻訳領域多型(\*372\_815del1443ins54)、

*HTRA1* 遺伝子プロモータの一塩基多型(rs11200638)の3つが挙げられている。本研究では、*HTRA1* 遺伝子多型と血清 CRP濃度の関係を検討した。

#### B. 研究方法

名古屋大学で健診を受けた476名を対象とした。血清CRP濃度を測定し、*HTRA1* 遺伝子 rs10490924 遺伝型を決定するとともに、喫煙歴、高血圧などの既往症の聴取、BMI測定などを行った。血清CRP濃度は、ラテックス凝集免疫比濁法を用いて高感度測定した。血液サンプルからDNAを精製し、遺伝子型はPCR法を用いて増幅した核酸を用いてシーケンシングを行い決定した。PASW® Statistics 18.0(IBM)を用いて統計解析を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に則り、名古屋大学の倫理委員会の承認の下で行った。十分な説明ののちに書面による同意を得た者を対象とした。

### C. 研究結果

対象者の遺伝子型は、非リスク遺伝子ホモ接合体群(G/G)177名(37%)、ヘテロ接合体群(A/G)235名(50%)、リスク遺伝子ホモ接合体群(A/A)64名(13%)であった。(以下、リスク群、ヘテロ群、非リスク群)対象者の背景因子を遺伝子型との関係から解析した(表1)ところ、飲酒歴は3群間で有意差を認めた。(P=0.049)

血清高感度CRP濃度(以下、hs-CRP)を遺伝子型によって比較したところ、相乗平均(mg/dL)は野生型0.037、ヘテロ0.035、リスク0.041で、有意差は検出されなかった(P=0.82)が、AMDの発症年齢である60歳で区切り60歳以上を解析すると野生型0.035、ヘテロ0.060、リスク0.071(mg/dL)となり、3群間で有意差があった。(P=0.032)次に、hs-CRPを、独立変数として年齢を用いて回帰分析した(表2)ところ、年齢とともにhs-CRPが上昇していた。年齢によるhs-CRPの変化は遺伝子型により異なっており、リスク遺伝子を持つものではhs-CRPの年齢変化が大きいことが示唆された。(P=0.020)

### D. 考察

これまでに、慢性炎症とAMDの関連は多く報告されてきたが、*HTRA1*遺伝子多型とCRPを含む炎症マーカーの関連は報告されていない。本研究の結果は、黄斑変性のない正常者で加齢に伴うCRP濃度上昇と*HTRA1*遺伝子型の関連を示唆するものであると考えられるが、この関連の由来は不明である。

*HTRA1*は加齢黄斑変性の早期病変であるドルーゼンに含まれていると報告されており、*HTRA1*はTGF- $\beta$ のシグナル伝達を抑制すると報告されている。TGF- $\beta$ を抑制す

ると血管内皮細胞の増殖が増加するという報告はあるが、AMDの病態と*HTRA1*の関連は不明である。また、AMDと*ARMS2/HTRA1*遺伝子多型の関係は連鎖する他の遺伝子多型によって起こっている可能性も否定できない。

### E. 結論

AMDではない者を対象とした解析で、*HTRA1*遺伝子のリスク染色体を持つ場合には加齢によるhs-CRP上昇が大きくなっており、これによりAMDの発症リスクが高まっている可能性も考えられる。本研究の結果は、AMDの遺伝的因子とAMDに関わるバイオマーカーとの関連を示唆している可能性がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Yasuma TR et al: Elevated C-reactive protein levels and *ARMS2/HTRA1* gene variants in subjects without age-related macular degeneration. *Mol Vis* 16, 2923-2930, 2010.

#### 2. 学会発表

なし

### 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

## I. 参考文献

1. Seddon JM, et al: Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. JAMA 291, 704-710, 2004.
2. Kikuchi M, et al: Elevated C-reactive protein levels in patients with polypoidal choroidal vasculopathy and patients with neovascular age-related macular degeneration. Ophthalmology 114, 1722-1727, 2007.
3. Klein RJ, et al: Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. Science 308, 385-389, 2005.
4. Fritsche LG, et al: Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. Nat Genet 40, 892-896, 2008.
5. Yang Z, et al: A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. Science 314, 992-993, 2006.

表1 rs11200638 遺伝子型と背景因子

	rs11200638 遺伝子型			計	P 値
	非リスク群	ヘテロ群	リスク群		
人数	177 (37%)	235 (49%)	64 (13.4%)	476	
平均年齢	49.8	49.1	51.8	49.7	0.32
女性	66 (37%)	87 (37%)	32 (50%)	185 (39%)	0.14
平均 BMI (SD)	22.9 (3.1)	22.6 (3.1)	22.4 (2.8)	22.7 (3.1)	0.42
既往歴					
高血圧	17 (10%)	32 (14%)	10 (10%)	59 (12%)	0.32
高脂血症	22 (13%)	32 (14%)	13 (20%)	67 (14%)	0.29
糖尿病	7 (4%)	9 (4%)	3 (5%)	19 (4%)	1
脳血管障害	6 (3%)	5 (2%)	4 (6%)	15 (3%)	0.25
虚血性心疾患	2 (1%)	9 (4%)	2 (3%)	13 (3%)	0.28
喫煙習慣					
ある	39 (22%)	47 (20%)	9 (14%)	95 (20%)	
以前あった	50 (28%)	74 (31%)	11 (17%)	135 (28%)	0.05
ない	88 (50%)	114 (49%)	44 (69%)	246 (52%)	
飲酒習慣					
週 1 回以上	88 (50%)	132 (56%)	23 (36%)	243 (51%)	
機会飲酒	9 (5%)	10 (4%)	2 (3%)	21 (4%)	0.04
ない	80 (45%)	93 (40%)	39 (61%)	212 (45%)	

背景因子と\*372\_815del443ins54 遺伝子型の関係を示した。人数についてはハーディーワインベルク平衡からの逸脱を検討した。平均年齢はクラスカルウォリス検定、年齢中央値は中央値検定、BMIはANOVA、その他は分割表検定を行い、P 値を示した。

表2 血清高感度 C-反応性タンパク濃度 (hs-CRP) の回帰分析.

rs 11200638 genotype		P 値 †	P 値 ‡
非リスク	対数化 hs-CRP = 0.010	× 年齢 - 3.8	0.020
ヘテロ	0.025	× 年齢 - 4.6	
リスク	0.040	× 年齢 - 5.2	
全体	0.022	× 年齢 - 4.4	

† 年齢を独立変数として対数化 hs-CRP の単回帰を行った。ヘテロ、リスクでは年齢の係数は有意であった。また、全体でも有意であった。

‡ 回帰分析の年齢変数は、野生型、ヘテロ、リスクの3群で有意差が見られた。

表3 血清高感度 C-反応性タンパク濃度と\*372\_815del443ins54 遺伝子型

a) 全年齢			
	人数 (割合)	幾何平均 (mg/dL)	幾何標準偏差
野生型	166 (36.6%)	0.0372	0.283
ヘテロ	226 (49.9%)	0.0349	0.337
リスク	61 (13.5%)	0.0409	0.400
全体	453	0.0365	0.325

b) 60 歳超			
	人数 (割合)	幾何平均 (mg/dL)	幾何標準偏差
野生型	36 (35.0%)	0.0353	0.226
ヘテロ	52 (50.4%)	0.0602	0.360
リスク	15 (4.3%)	0.0713	0.619
全体	103	0.0512	0.352

c) del-ins 遺伝子型による hs-CRP 値の差の P 値			
	a) 全年齢	b) 60 歳超	
優性モデル	0.79	0.011	
劣性モデル	0.41	0.43	
加法モデル	0.81	0.032	

hs-CRP 値を a) 全年齢、b) 60 歳超に分けて示した。

それぞれの年齢層で、del-ins 遺伝子型による hs-CRP 値の検定を行い、c) に P 値を示した。

## 28. ポリープ状脈絡膜血管症の亜型分類と感受性遺伝子の関係

田中公二<sup>1)</sup>、中山智祥<sup>2)</sup>、川村昭之<sup>1)</sup>、森隆三郎<sup>1)</sup>、湯澤美都子<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>日本大・駿河台、<sup>2)</sup>日本大板橋臨床検査医学)

**研究要旨** ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)には polypoidal CNV と狭義 PCV の二つの亜型があるとの報告がある。PCV は、ARMS2 遺伝子の A69S 多型、CFH 遺伝子の I62V 多型と関連があるとの報告がある。2008 年 3 月から 2010 年 3 月に PCV と診断された 287 例につき、カラー眼底写真、インドシアニングリーン蛍光眼底造影によって、polypoidal CNV と狭義 PCV に分類した (polypoidal CNV 85 例、狭義 PCV 202 例)。二つの亜型患者より採血をして、ARMS2 遺伝子の A69S 多型、CFH 遺伝子の I62V 多型について調べた。加齢黄斑変性(AMD)ではない患者 277 例からも採血して、同様に ARMS2 遺伝子の A69S 多型、CFH 遺伝子の I62V 多型を調べて対照とした。ARMS2 では、狭義 PCV 患者は対照患者と比較して有意差がなかった ( $p=0.9611$ ) が、polypoidal CNV の患者は対照患者と比較して有意に関連があった ( $p<0.0001$ )。CFH では狭義 PCV、polypoidal CNV 共に対照患者と比較して有意に関連があった。(狭義 PCV;  $p=0.0001$ 、polypoidal CNV;  $p<0.0001$ )

狭義 PCV は PCV の感受性遺伝子である ARMS2 とは関連がないことが示された。狭義 PCV は polypoidal CNV と病態が異なる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)を狭義 PCV と polypoidal CNV に分類し、PCV の感受性遺伝子である ARMS2 (A69S)、CFH (I62V) との関連を調べる。

### B. 研究方法

対象は PCV 患者 287 名 (狭義 PCV 202 名、polypoidal CNV 85 名) AMD と関連のない対照患者 277 名。

方法は、PCV の患者を全例フルオレセイン蛍光眼底造影、インドシアニングリーン蛍光眼底造影、カラー眼底写真で狭義 PCV、polypoidal CNV に分類し、それぞれの患者と対照患者の ARMS2 (A69S)、CFH (I62V) 遺伝子多型を調

べた。

PCV の 2 亜型と対照患者の ARMS2 遺伝子の A69S 多型、CFH 遺伝子の I62V 多型の遺伝子型を比較する case-control study を行った。統計はカイ二乗検定を用いた。

#### (倫理面への配慮)

駿河台日本大学病院倫理委員会承認後、参加した患者全例よりインフォームドコンセントを得て書面による同意を得た。

### C. 研究結果

ARMS2 遺伝子多型では、狭義 PCV 患者は対照患者と比較して有意差がなかった ( $p=0.9611$ ) が、polypoidal CNV の患者は対照患者と比較して有意に関連があった

( $p < 0.0001$ )。CFH 遺伝子多型では狭義 PCV、polypoidal CNV 共に対照患者と比較して有意に関連があった。(狭義 PCV ;  $p = 0.0001$ 、polypoidal CNV ;  $p < 0.0001$ )

#### D. 考察

PCV については、yuzawa らが polypoidal CNV と狭義 PCV の2つの亜型に分類して、2005 年に発表しているが、その是非については未だ結論が得られていない。今回我々は PCV を2つの亜型に分類し、PCV の感受性遺伝子として確定的な ARMS2、CFH (I62V) について検討した。その結果、PCV の2つの亜型のうち、狭義 PCV は ARMS2 では関連がないことが示された。AMD の特殊病型である狭義 AMD、PCV、網膜血管腫状増殖のいずれもが ARMS2 と深い関連を示した報告があることから、狭義 PCV は polypoidal CNV、ひいては AMD とは異なる病態を持つ可能性が示された。一方で CFH (I62V) については両亜型とも対照群と比較して有意差がみられた。よって狭義 PCV は加齢黄斑変性の特殊型である可能性は高い。

この狭義 PCV を調べることで、最も AMD と関連が深く、今まで不明だった ARMS2 遺伝子の機能の解明が進むことが期待できるであろう。

#### E. 結論

狭義 PCV は PCV の感受性遺伝子である ARMS2 とは関連がないことが示された。狭義 PCV は polypoidal CNV と病態が異なる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

#### 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

#### I. 参考文献

1. Kondo N et al: Am J Ophthalmol, 2007.
2. Hayashi H et al: Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010.
3. Kondo N et al: Ophthalmology, 2009.
4. Yuzawa M et al: Br J Ophthalmol, 2005.

図1 各病型の ARMS2 遺伝子の遺伝子型分布

	Polypoidal CNV		狭義 PCV		Total PCV		control	
	(%)		(%)		(%)		(%)	
G/G	8	(9)	72	(25)	80	(28)	99	(36)
G/T	24	(28)	102	(42)	126	(44)	142	(51)
T/T	53	(62)	28	(33)	81	(28)	36	(13)
p 値	<0.0001*		0.9611		<0.0001*			

図2 各病型の CFH 遺伝子の遺伝子型分布

	Polypoidal CNV		狭義 PCV		Total PCV		control	
	(%)		(%)		(%)		(%)	
G/G	53	(62)	111	(55)	164	(57)	100	(36)
G/A	32	(38)	77	(38)	109	(38)	141	(51)
A/A	0	(0)	14	(7)	14	(5)	36	(13)
p 値	<0.0001*		<0.0001*		0.0001*			

## 29. 滲出型加齢黄斑変性の表現形および光線力学療法への 反応性に関連する遺伝子多型の探索と個別化医療への応用

本田 茂、別所弘明、松宮 亘、楠原仙太郎、塚原康友、根木 昭  
(神戸大)

**研究要旨** 滲出型加齢黄斑変性(AMD)における表現型および光線力学療法(PDT)の効果に関連する遺伝子多型の検討を行った。*ARMS2* 遺伝子の rs10490924(A69S)多型は PCV の初診時最大病巣径(GLD)と有意な相関が認められた( $p=0.00073$ )が、初診時矯正視力との相関は認めなかった。さらに同多型は PDT12 ヶ月後の矯正視力と有意な相関を認めた。また、PCV 群において *補体 H 因子(CFH)* 遺伝子の rs1061170 (Y402H) 多型と rs1410996 多型は初診時矯正視力や GLD との相関は認めなかったものの、PDT 後における病巣の解剖学的な改善との相関があった(各々  $p=0.026, 0.032$ )。さらに rs1410996 多型は PDT12 ヶ月後の矯正視力とも有意な相関を認めた( $p=0.0036$ )。今後、自然経過や治療効果の持続性などとの関連を調べるためにより長期の検討を要するが、これらの遺伝子多型は AMD の個別化医療の展開に有用である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

滲出型加齢黄斑変性(AMD)はその表現形(病型、大きさなど)によって自然経過や光線力学療法(PDT)への反応性が異なるが、最近ではその表現形および臨床経過に関連する遺伝子多型の探索が盛んに行われている。我々の施設では AMD の様々な表現形と関連する幾つかの遺伝子多型を同定したので報告する。

### B. 研究方法

対象は当院で PDT 単独療法を施行された狭義 AMD68 例、ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)119 例で、各群の初診時の矯正視力、最大病巣径(GLD)と関連のある遺伝子多型を検索した。また、上記の群で PDT 後 12 ヶ月時点での矯正視力に関連する遺伝子多型を検索した。さらに眼底写真、蛍光眼底造影、光干

渉断層計(OCT)を元に判断した初回 PDT 後 6 ヶ月時点における病巣の解剖学的改善に関連する遺伝子多型の検討も行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は神戸大学倫理委員会の承認済みである。各患者は遺伝子研究における目的および個人情報の保護に関する説明を受け、同意した場合のみ研究対象に加えた。

### C. 研究結果

*ARMS2* 遺伝子の rs10490924(A69S)多型は PCV の初診時 GLD と有意な相関が認められた( $p=0.00073$ )が、狭義 AMD の初診時 GLD との相関は有意でなかった。また、同多型は狭義 AMD と PCV の初診時矯正視力との相関は認めなかった。一方、同多型は狭義 AMD と PCV における PDT12 ヶ月後の矯正視力と有意



な相関を認めた[図 1、2]。

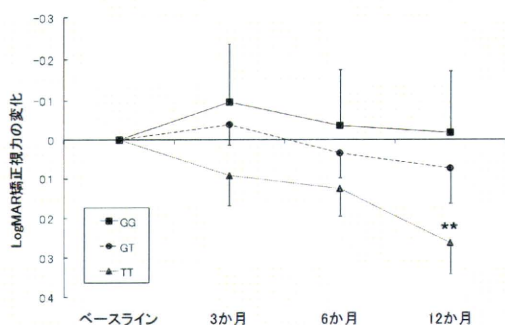


図1 狭義AMDにおけるA69S多型とPDT後視力変化の関連  
(遺伝子型;実線 GG,破線 GT,点線 TT) \*\* p<0.01

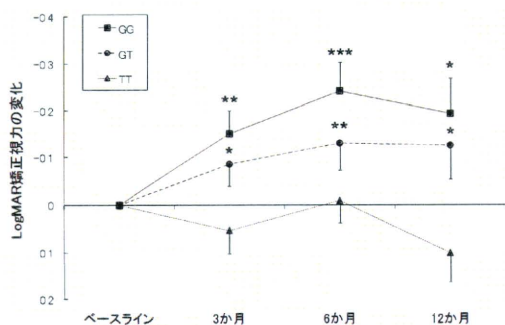


図2 PCVにおけるA69S多型とPDT後視力変化の関連  
(遺伝子型;実線 GG,破線 GT,点線 TT) \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001

SNP ID	局在	メジャー/マイナーアレル	マイナーアレル頻度		相関結果		
			改善群	非改善群	アレルオッズ比 (95%CI)	P値	補正P値
rs800292	Exon 2 (f62V)	G/A	0.22	0.29	1.47 (0.71-3.03)	0.3	0.34
rs1061170	Exon 9 (Y402H)	T/C	0.13	0.02	0.13 (0.09-0.63)	0.026	0.026
rs1410996	Intron 14	C/T	0.25	0.42	2.17 (1.10-4.17)	0.024	0.032

表1 CFH 遺伝子多型とPDT後の解剖学的改善との関連

また、PCV群において補体H因子(CFH)遺伝子のrs1061170 (Y402H) 多型とrs1410996多型は初診時矯正視力やGLDとの相関は認めなかったものの、PDT後における病巣の解剖学的な改善との相関があった(表1)。さらにrs1410996多型はPDT12ヵ月後の矯正視力とも有意な相関を認めた(p=0.0036)。

#### D. 考察

遺伝子多型が各種治療の効果に相関するという報告は糖尿病、感染症、腫瘍関連などの分野で盛んに行われている。眼科領域で遺伝子多型と治療効果の関連を証明した報告は少ないが、その中でもAMDに関するものが目立つ。ARMS2 A69S多型とPDTの効果に関しては欧米から少数の報告が出ているが、いずれも関連性を否定するものであった。一方、我が国に多いPCVに限って検討を行った報告ではARMS2 A69S多型とPDT後の視力予後には相関を認めたとしている。元来、PDTの効果は狭義AMDよりもPCVにおいて優れていることが複数の報告から明らかとなっており、今回の我々の検討でもその傾向は確認された。また、CFH Y402H多型とPDTの効果の関連性においても賛否両論が存在するが、欧米でその関連性を認めたという報告では、今回の我々の結果と同様、AMD発症に対するリスクアレル(Cアレル)がPDT有効群に有意に多かった。これは疾患に対するリスクアレルと治療効果に対するリスクアレルが相反するという点において大変興味深い。各種治療に対する反応性の個人差は臨床的によく見られる現象であるが、これらを説明するのに遺伝子多型の結果が有用である可能性が示唆された。

#### E. 結論

日本人AMDにおけるPDT後の視力や解剖学的改善と特定の遺伝子多型との相関が明らかとなった。今後、より多くの症例における検討を要する一方、これらの遺伝子多型はAMDの個別化医療の展開に有用である可能性が期待される。



## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kondo N et al: Complement Factor H Y402H Variant and Risk of Age-Related Macular Degeneration in Asians: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmology* Sep 22, 2010 [Epub ahead of print]
2. Bessho H et al: Natural course and fundusoscopic findings of polypoidal choroidal vasculopathy in a Japanese population over one year of follow-up. *Retina*, in press 2011.
3. Bessho H et al: Positive association of *complement factor H* gene variants with the effect of photodynamic therapy in polypoidal choroidal vasculopathy. *J Clin Exp Ophthalmol* in press 2011.

### 2. 学会発表

1. Honda S: Genetic characteristics of Polypoidal Choroidal Vasculopathy (PCV) in Japanese population. *Macula of Paris*, Paris, 2010.
2. 本田 茂: 近未来の加齢黄斑変性治療を理解するために必要なゲノム学概説 加齢黄斑変性と遺伝子多型. 第 64 回日本臨床眼科学会、神戸、2010.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

特記事項なし

## I. 参考文献

1. Mori K, et al: Phenotype and genotype characteristics of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology* 117, 928-938, 2010.
2. Tsuchihashi T, et al: Complement Factor H and High-Temperature Requirement A-1 Genotypes and Treatment Response of Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 118, 93-100, 2011.
3. Chowers I, et al: Sequence variants in HTRA1 and LOC387715/ARMS2 and phenotype and response to photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration in populations from Israel. *Mol Vis* 14, 2263-2271, 2008.
4. Brantley MA Jr, et al: Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to photodynamic therapy. *Eye (Lond)* 23, 626-631, 2009.
5. Sakurada Y, et al: LOC387715 A69S genotype with visual prognosis after photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Retina* 30, 1616-1621, 2010.

## 30. 多施設からの網膜変性疾患試料収集

### および遺伝子診断システムの構築

石上智愛<sup>1)</sup>、和田裕子<sup>3)4)</sup>、村上 晶<sup>4)</sup>、岩田 岳<sup>5)</sup>、万代道子<sup>1)2)</sup>、高橋政代<sup>1)2)</sup>

(<sup>1)</sup>理化学研究所、<sup>2)</sup>神戸市立医療センター中央市民病院、<sup>3)</sup>わだゆうこ眼科クリニック、

<sup>4)</sup>順天大、<sup>5)</sup>東京医療センター臨床研究センター)

**研究要旨** 網膜変性疾患の遺伝子診断は、網膜変性の原因解明や遺伝子治療の可能性から、臨床と研究両方の場で遺伝子診断が必要とされている。しかし、網膜変性疾患の原因遺伝子は多岐にわたり、網羅的な遺伝子解析が必要であるため、各々の施設で遺伝子診断を行うには限界がある。そこで、我々はこれまで多施設からの症例の遺伝子診断を、臨床検査として集中した施設で行う遺伝子診断サービスを目指して遺伝子診断システムの構築に取り組んできた。今回、新たに試料収集システムを検討し、網膜変性疾患遺伝子データベースを構築した。2010年4月から10月まで網膜変性疾患43例の遺伝子診断を行い、その結果、7例で遺伝子変異を検出した。

#### A. 研究目的

網膜変性患者の遺伝子診断は、原因遺伝子が多岐にわたるため、各施設で遺伝子診断を行うことが困難である。我々は、これまで複数の外部施設と臨床所見や試料のやりとりを行いながら、登録用の症例データベースを含む遺伝子診断システムの構築に取り組んできた。今回、さらに多施設のニーズに応える集中検査施設を目指して試料収集システムを検討した。また、遺伝子診断から得る遺伝子情報と臨床情報を総合的に解析し診断・治療・研究に役立てることを目指し、網膜変性疾患遺伝子データベースを構築したので、2010年4月から10月に行った遺伝子診断結果と併せ報告する。

#### B. 研究方法

これまで検査していた遺伝子箇所は、常染色

体優性、常染色体劣性、X連鎖劣性の網膜変性疾患原因遺伝子として報告のあるエクソンを117個追加し、計エクソン173個(遺伝子41個)を解析できるようプライマーのセットアップを行った。また、臨床検査として一定の基準で遺伝子検査を行うためにプロトコルを作成した。

2010年4月から2010年10月まで神戸市立医療センター中央市民病院、先端医療センター病院、わだゆうこ眼科クリニック、名古屋大学眼科、宮崎大学眼科、他計7施設からの網膜変性疾患43例の末梢血よりゲノムDNAを抽出した。PCR法で各々の遺伝子を増幅し、WAVEを用いたdHPLC法とDirect-sequencing法を組み合わせ変異解析を行った。

遺伝子診断システムの構築を目指し、医薬基盤研究所と試料収集システムの検討を行っ

た。

#### (倫理面への配慮)

各施設の倫理委員会に計画書を提出し承認された。計画は厚労省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」にのっとり、患者からのインフォームドコンセントを得て採血した。個人情報に連結可能匿名化して厳重に管理している。

#### C. 研究結果

網膜色素変性 37 例中 4 例、眼底白点症 4 例中 2 例、若年網膜分離症 2 例中 1 例、計 43 例中 7 例で遺伝子変異を検出した。

医薬基盤研究所の難病研究資源バンクの規定に基づいて検体情報を管理し、匿名化や検体試料の収集・取り扱い・分譲を行う試料収集システムを検討した。

既存の臨床情報データベースに加え遺伝子情報データベースを構築し、これらを統合した網膜変性疾患遺伝子データベースの運用を検討した。

#### D. 考察

今回検討した試料収集システムと網膜変性疾患遺伝子データベースの運用により、多施設からの遺伝子診断がより円滑に進められると考えられる。

#### E. 結論

複数施設と試料や臨床情報、遺伝子解析結果のやりとりを問題なく行うことができた。これまで遺伝子診断を行ってきた経験と今回の遺伝子診断システムの改良から、我々が目指す遺伝子診断サービスが実現できると考えられる。遺伝子診断サービスを行う中で、得られた遺伝子情報をデータベースに蓄積する。同時に

詳細な臨床情報と遺伝子診断による遺伝子情報データベースに蓄積する。このデータベースを総合的に解析し、各原因遺伝子の頻度と網膜変性のタイプ、進行の相違の検討など研究・診断・治療に役立てる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

## 31. 脂溶性ビタミン欠乏による網膜変性と視機能障害

村上 晶、河野博之

(順天大)

**研究要旨** Abetalipoproteinemia による脂溶性の欠乏による網膜変性をきたした Bassen-Kornzweig 症候群1例と血液透析患者に合併したビタミン A 欠乏症と推定される視機能障害をきたした2例の治療を行なった。Bassen-Kornzweig 症候群の症例では、ビタミン A とビタミン E の大量投与を行なったが視機能改善は得られず、光干渉断層計(OCT)では網膜全層にわたる菲薄化が観察された。ビタミン A 欠乏症の2例はビタミン A 内服投与により、自覚症状の改善と網膜電図(ERG)の回復が得られた。血液透析患者にビタミン A 欠乏による視機能障害を持つ例が少なからずいるのではないかと推定された。

### A. 研究目的

網膜色素変性の治療としてビタミン A およびビタミン E の投与が行なわれるが、これらの不足による網膜機能障害を経験することは近年稀である。Abetalipoproteinemia による脂溶性ビタミンの欠乏による網膜変性をきたした1例と血液透析患者に合併したビタミン A 欠乏症と推定される視機能障害をきたした2例とを経験したので報告する。

### B. 研究方法

症例報告、後ろ向き検討

(倫理面への配慮)

臨床研究はヘルシンキ宣言を遵守して行なった。

### C. 研究結果

**症例1:**40代女性。視力障害を主訴に受診。20年前に家族性の低コレステロール血症と診断されていた。右視力(0.7)左視力(0.8)。白点を伴う色素沈着を伴う眼底所見を呈し、

OCTでの観察では、網膜全層が菲薄化していた。(図1)。総コレステロール 51mg/dl(基準値 219-150) 中性脂肪 5mg/dl(基準値 149-30)、抹消血に有棘赤血球をみとめた。生化学的な検査およびこれまでの病歴から Abetalipoproteinemia (Bassen-Kornzweig 症候群)による網膜変性と診断<sup>1</sup>。ビタミン A とビタミン E の大量投与により、眼底の白点は徐々に減少したが、視力の改善は軽度にとどまった。

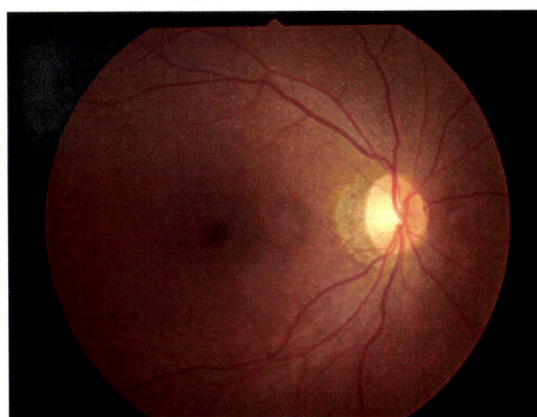


図1. 症例1 右眼 眼底写真

**症例2:**70代男性。慢性腎不全による血液透



析患者。数年来の見え方の違和感があった。眼底に白点状の沈着物が認められた。(図 2、図 3)。陰性 ERG が観察されたが、15 年前の白内障術前検査の ERG は正常であることが確認された。血清ビタミン A 値は正常範囲内であったが、臨床経過からビタミン A 欠乏を疑いビタミン A 内服投与した。治療開始 10 日前後で夜盲感の消失と視力の改善が得られた。ERG も正常化した。



図 2. 症例 2 左眼後極部 眼底写真



図 3. 症例 2 左眼周辺部 眼底写真

**症例 3:** 72 歳男性。慢性腎不全による血液透析患者。視力低下が 1 年前より急速に進み、いつも薄暗く感じていた。眼底には著変ないが、陰性 ERG であった。ビタミン A 内服投与を開始したところ自覚症状の改善がえられ、ERG も正常波形に近くまで回復した。

#### D. 考察

Bassen-Kornzweig 症候群は、稀な疾患であるが、通常の網膜色素変性と異なりビタミン A とビタミン E 投与により視機能障害の進行を抑制しうる症候性の網膜色素変性とされている。今回、我々の経験した症例では、内科的な診断が行なわれた時点では視機能に関する自覚症状に乏しかったためか治療が中断していたようである。腎不全ではレチノール結合蛋白 (RBP) が上昇するが、血中レチノールの低下は死亡率を高める単独の要因である観察がある<sup>2</sup>。血液透析患者におけるビタミン A の眼局所での動態に関する知見は少ないが、潜在的に栄養障害をきたしやすいことを考慮するとビタミン A 欠乏による視機能障害が起こりやすいと思われる。

#### E. 結論

脂溶性ビタミンの長期間にわたる欠乏は網膜全層にわたる器質的な障害をきたす。血液透析患者ではビタミン A 欠乏による網膜機能障害をもつ例は潜在的には多い可能性があると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ono K, et al: Global inequality in eye health: country-level analysis from the Global Burden of Disease Study. *Am J Public Health* 100, 1784-1788, 2010.
2. Kartasasmita AS, et al: A novel nonsense mutation in rhodopsin gene in two Indonesian families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genetics*, in press
3. 村上晶: 網膜変性疾患の網羅的遺伝子解

析. 日本の眼科 597、1530-1533、2010.

## 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願

該当するものなし

## I. 参考文献

1. Ohashi K, et al: Novel mutations in the microsomal triglyceride transfer protein gene causing abetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 41, 1199-204, 2000.
2. Kalousová M, et al: Lower retinol levels as an independent predictor of mortality in long-term hemodialysis patients: a prospective observational cohort study. *Am J Kidney Dis* 56, 513-521, 2010.



## 32. 機能性が高い血管内皮前駆細胞の網膜色素変性症への

### 投与効果に関する研究

福田慎一<sup>1)2)</sup>、長野真澄<sup>2)</sup>、山下年晴<sup>2)</sup>、大根田修<sup>2)</sup>、大鹿哲郎<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>筑波大、<sup>2)</sup>筑波大再生幹細胞生物学)

**研究要旨** 網膜色素変性症は日本において中途失明の三大原因の一つであり、杆体細胞が主に障害されると同時に、網膜血管の委縮も徐々に進行していく。現在、血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた虚血性疾患に対する細胞治療の有効性について報告されている一方で、期待したほどの効果が得られていないとの報告もなされている。即ちEPCは、均一の集団ではなく、その中に虚血改善能の低いEPCも含まれていることを示唆するものである。今回、我々はAldehyde dehydrogenase (ALDH)活性を指標とし、機能性の高いEPCの分離を試み、ALDH活性の低いEPC(Alde-Low EPC)において増殖能・虚血改善能が高いことを明らかにした。この機能性が高いAlde-Low EPCを用いて、神経変性疾患であるとともに血管委縮性疾患でもある網膜色素変性モデルマウスへ投与し、血管・神経保護作用について検討を行った。その結果機能性が高いAlde-Low EPCは、網膜色素変性症における血管委縮および神経変性に対して抑制的に作用することが明らかとなった。

#### A. 研究目的

機能性が高い血管内皮前駆細胞(Alde-Low EPC)を用いて、神経変性疾患であるとともに血管委縮性疾患でもある網膜色素変性モデルマウスへ投与し、血管・神経保護作用について検討を行うこと。

#### B. 研究方法

C3H系マウスはPde6b(rd1)に遺伝子点変異があり約4週で視細胞の消滅および網膜深層血管の委縮を認める。

生後6日のC3H系マウスをアバチン(0.9gトリプロモエタノール+625 $\mu$ l イソアミルアルコール/50ml)を0.16-0.20ml/g腹腔注射にて全身麻酔。生後6日のC3H系マウスはまだ開眼して

いないためスプリングハンドル剪刀にて切開、その後市販散瞳用点眼液ミドリンP(参天製薬)を一滴点眼し散瞳させた後、33G イトマイクロスリンジにてAlde-LowおよびHigh EPC、HUVEC、PBSを硝子体内注射(1~2 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/0.5 $\mu$ l)、網膜下注射(0.5~1 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/0.2~0.3 $\mu$ l)を行った。生後10日、13日、17日、21日に病理学的組織解析および免疫染色を用いてマウス網膜視細胞層、網膜深層血管評価を行った。

手術は必ず実験動物熟練者が行った。術者名は、眼科医として臨床や動物(ラット)実験において経験が豊富な医師が担当することにより、手技による苦痛軽減を図った。飼育担当者と日々連絡を取り、適切な管理を実施した。硝

子体・網膜下注射後安定したのちにマウスに疼痛などの苦痛が起こる可能性は低い、苦痛が起きたと判断される場合はマウスを頸椎脱臼にて安楽死させることとした。

### C. 結果

C3H系マウスはPde6b(rd1)に遺伝子点変異があり約4週で視細胞の消滅および網膜深層血管の委縮を認めた。Alde-Low EPCを投与した群では、Alde-High EPC、HUVEC、PBS投与群と比較して有意に血管委縮および神経変性に至る速さを抑制した( $p < 0.01$ ) (図1, 図2)。さらにAlde-Low EPCは視細胞層におけるアポトーシスを有意に抑制した。

図1

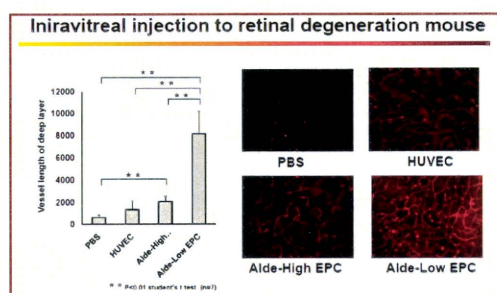
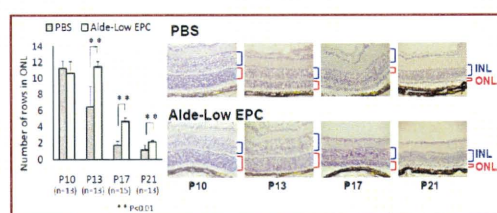


図2



### D. 考察

網膜色素変性症の治療法に関して、遺伝子治療、網膜移植、人工網膜などの研究が主として動物実験で行われている。そのうちのひとつとして造血幹細胞(HSC)が含まれている骨髄を網膜色素変性症のモデルマウスの硝子体に注入することにより視細胞の変性の一部をくい

止める事が報告された(Otani A, et al: Nat Med 8, 1004-1010, 2002)(Otani A et al: J Clin Invest 114, 765-774, 2004)。骨髄には造血幹細胞以外に、EPCが含まれており、EPCが網膜血管の委縮を抑制し、血流が保たれることにより神経保護因子の枯渇が抑制され視細胞の変性の一部をくい止めるのではないかと推測されている。

近年、狭心症・心筋梗塞・閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対して、骨髄・末梢血EPCを用いた臨床応用が国内外で行われている。現在治療に用いているEPC採取方法は、CD34陽性細胞を分離し使用する方法、細胞を分画せずに全体を使用する方法の2通りであるがまだ画期的な効果が上がっているとは言い難い。EPCには階層性があり、未分化で増殖能の高いEPCと、増殖能の低いEPCが混在していることが報告された(Ingram DA et al: Blood 104, 2752-2760, 2004)。増殖性の高いEPCを分離するのに有効なマーカーについて報告がなかったが、我々はAldehyde dehydrogenase (ALDH)活性の低いEPCにおいて細胞増殖能が高いことが明らかにした(Nagano M et al: Blood 110, 151-160, 2007)。今回我々は、活動性が高いAlde-Low EPCを硝子体内注射および網膜下注射することにより、血管委縮および神経変性に至る速さを抑制した。一方活動性の低いAlde-High EPCは血管委縮および神経変性に至る速さを抑制しなかった。今後この両者Alde-LowおよびHigh EPCを比べることにより関与している血管・神経保護因子を解明していく予定である。

### E. 結論

機能性が高いAlde-Low EPCは、網膜色素変性症における血管委縮および神経変性に対し

て抑制性に作用することが明らかとなった。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

**1. 論文発表**

なし

**2. 学会発表**

なし

**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

### 33. 網膜色素変性に合併した黄斑浮腫に対する

#### 塩酸ドルゾラミド点眼の長期経過

池田康博、久富智朗、吉田倫子、納富昭司、宮崎勝徳、石橋達朗  
(九州大)

**研究要旨** 網膜色素変性(RP)に生じる黄斑部合併症のひとつである黄斑浮腫に対して、緑内障治療薬である塩酸ドルゾラミド点眼(炭酸脱水酵素阻害剤)が浮腫改善効果を持つことが明らかとなった。今回、その長期経過について検討した。対象は、九州大学病院で黄斑上膜や硝子体牽引のない黄斑浮腫を合併した定型 RP 患者で、全例で両眼に 1.0%塩酸ドルゾラミド点眼を 1 日 3 回使用した。点眼開始 6 ヶ月後までに 7 例 11 眼で浮腫は減少したが、最終観察時点において、そのうち 3 例 4 眼で浮腫の再発が認められた。ハンフリー10-2 における中心 12 点(中心 6°)の平均感度も悪化した症例はなく、4 例 4 眼で投与前よりも改善していた。RP に合併した黄斑浮腫に対して塩酸ドルゾラミド点眼は有用であるが、再発する症例もあり、注意深い観察が必要である。

#### A. 研究目的

網膜色素変性(RP)に生じる黄斑部合併症のひとつに黄斑浮腫があり、発症率は 10%前後とされている(文献1、2)。これまでに、硝子体手術やトリアムシノロンアセトニド投与などによる治療が報告されているが(文献3、4)、一定の見解は得られていない。我々は、RP に合併する黄斑浮腫に対する塩酸ドルゾラミド点眼液(炭酸脱水酵素阻害薬)の浮腫改善効果を確認した。今回、1年間以上の長期間の経過について、効果ならび副作用の面から検討した。

#### B. 研究方法

対象は、九州大学病院で黄斑上膜や硝子体牽引のない黄斑浮腫を合併した定型 RP 患者で1年以上経過観察可能であった、7 例 13 眼(男性 1 例、女性 6 例)。全例で両眼に 1.0%塩酸ドルゾラミド点眼を 1 日 3 回使用した。投与

前、投与後に、視力、眼圧、細隙灯検査、静的視野検査(ハンフリー視野計プログラム 10-2)、眼底検査、光干渉断層計(Cirrus SD-OCT)による平均中心窩網膜厚測定を施行した。

#### (倫理面への配慮)

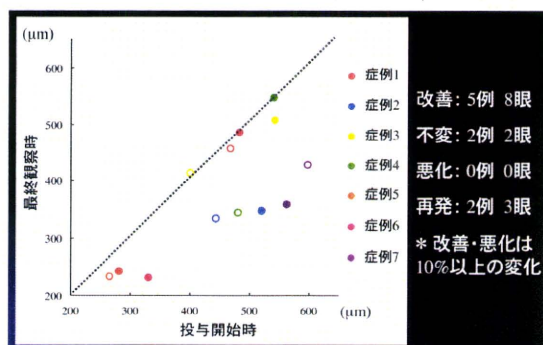
ヘルシンキ宣言を遵守し、臨床研究を行った。十分な説明を行った後にインフォームドコンセントを得、個人情報機密保持を厳守する。学内の倫理委員会の承認を得た。

#### C. 研究結果

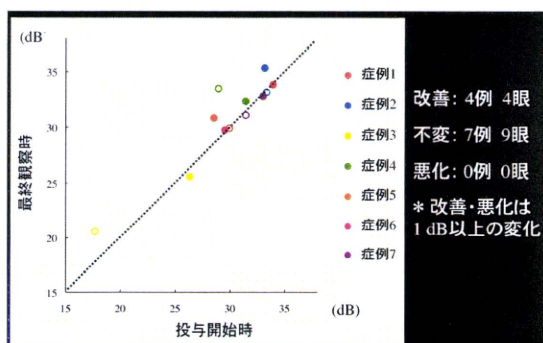
点眼開始 6 ヶ月後までに 7 例 11 眼で浮腫は減少したが、最終観察時点において、そのうち 2 例 3 眼で浮腫の再発が認められた(図1)。視力が投与前よりも低下した症例はなかった。ハンフリー10-2 における中心 12 点(中心 6°)の平均感度(黄斑部感度)も悪化した症例はなく、



4例4眼で投与前よりも改善していた(図2)。また、全症例で全身ならびに眼局所に副作用は認められなかった。



(図1)OCTによる平均中心窩網膜厚の経時的変化



(図2)HFA10-2による黄斑部感度の経時的変化

#### D.E. 考察・結論

RP に合併した黄斑浮腫に対して塩酸ドルゾラミド点眼は有用であるが、再発する症例もあり、注意深い観察が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 池田康博、他:網膜色素変性に合併した黄斑浮腫に対する塩酸ドルゾラミド点眼の効果

第63回日本臨床眼科学会、福岡、2009.

- 池田康博、他:網膜色素変性に合併した黄斑浮腫に対する塩酸ドルゾラミド点眼の長期経過 第49回日本網膜硝子体学会、大阪、2010.

#### 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

#### I. 参考文献

- Fishman GA, et al: Foveal lesions seen in retinitis pigmentosa. Arch Ophthalmol 95, 1993-1996, 1977.
- Hirakawa H, et al: Optical coherence tomography of cystoid macular edema associated with retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol 128, 185-191, 1999.
- García-Arumí J, et al: Vitreoretinal surgery for cystoid macular edema associated with retinitis pigmentosa. Ophthalmology 110, 1164-1169, 2003.
- Saraiva VS, Sallum JM, Farah ME: Treatment of cystoid macular edema related to retinitis pigmentosa with intravitreal triamcinolone acetonide. Ophthalmic Surg Lasers Imaging 34, 398-400, 2003.

## 34. UF-021 0.15%点眼液の網膜色素変性を対象とした第2相臨床試験

山本修一<sup>1)</sup>、菅原岳史<sup>1)</sup>、中沢 満<sup>2)</sup>、町田繁樹<sup>3)</sup>、村上 晶<sup>4)</sup>、直井信久<sup>5)</sup>、

和田裕子<sup>6)</sup>、三宅養三<sup>7)</sup>、真島行彦<sup>8)</sup>

<sup>1)</sup>千葉大、<sup>2)</sup>弘前大、<sup>3)</sup>岩手医大、<sup>4)</sup>順天大、<sup>5)</sup>宮崎大、

<sup>6)</sup>わだゆうこ眼科、<sup>7)</sup>愛知医大、<sup>8)</sup>アールテック・ウエノ

**研究要旨** 網膜色素変性を対象とし、無作為化二重盲検並列3群間比較試験(6施設共同試験)により、UF-021 0.15%点眼液の安全性および有効性を探索した。網膜色素変性患者を対象として、プラセボを対照に、UF-021 0.15%点眼液を1回1滴または1回2滴(5分間隔)を1日2回24週間点眼投与し、主要有効性評価項目としてMP-1微小視野計による中心2度(4点)の網膜感度の改善効果を評価した(用量反応性)。副次的な有効性評価項目として、logMAR 視力、コントラスト感度、MP-1微小視野計中心10度(24点)の網膜感度、ハンフリー視野計(SITA-Standard)10-2の網膜感度(MD値および中心4点)、VFQ-25(コンポ8)、投与前OCT検査所見との関連性を評価した。症例登録期間は2008年12月25日~2009年8月3日で、プラセボ群35名、1滴群39名、2滴群は38名であった。MP-1中心2度(4点)の平均網膜感度の変化値を用いた用量反応性は、共変量による調整後、回帰分析の結果、有意な用量反応性が認められた( $P=0.038$ )。平均網膜感度の前観察期からの変化値について、4dB以上悪化した症例がプラセボ群(21.2%)と比較し2滴群(2.6%)で統計学的に有意に少なかった( $P=0.021$ )。VFQ-25(コンポ8)の下位尺度「見え方による社会生活機能」の変化値に、単回帰分析による統計学的に有意な用量反応性が認められた( $P=0.001$ )。重篤な副作用は認められなかった。UF-021 0.15%点眼液の1回2滴24週間点眼は忍容性が高く、網膜色素変性患者の網膜感度を改善するとともに悪化を防止し、見え方によるQOLを改善する薬剤であると考えられた。

### A. 研究目的

イソプロピル・ウノプロストンには神経保護効果があることが報告されており、その0.12%点眼液が網膜色素変性患者において、視野や自覚症状の改善をもたらすことも報告されている。また網膜色素変性30例を対象としたパイロットスタディにおいて、6ヶ月間の0.12%ウノプロストンの点眼により黄斑部網膜感度の改善が得られることが明らかになっている。そこで今回は、無作為化二重盲検並列3群間

比較試験により、より高濃度のウノプロストン(UF-021)0.15%点眼液の安全性および有効性を探索した。

### B. 研究方法

網膜色素変性患者を対象として、6施設共同試験を行った。主な選択基準は20歳以上65歳以下、視力0.5以上、中期以降の視野異常、MP1微小視野計による中心2度以内の平均網膜感度が6~16dB。プラセボを対照に、