

201122043A

厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究事業

緑内障の multiple rare variants の発見と病態機序の解明による  
予防・治療法の開発

平成23年度 総括研究報告書

平成24年5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

厚生労働科学研究費補助金 障害者対策総合研究事業

緑内障の multiple rare variants の発見と病態機序の解明による

予防・治療法の開発

(H22-感覚-一般-002)

平成23年度 総括研究報告書

平成24年5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>

緑内障の multiple rare variants の発見と病態機序の解明による予防・治療法の開発

班員名簿（平成24年5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	溝田 淳 木村 至 谷戸正樹 渡辺すみ子 原 英彰	帝京大学医学部眼科 順天堂大学医学部浦安病院眼科 島根大学医学部眼科 東京大学医科学研究所再生基礎医科学寄付研究部門 岐阜薬科大学薬効解析学研究室	教授 准教授 講師 特任教授 教授
事務局	能見けいこ	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） 分子細胞生物学研究部 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL (03)3411-0111 (内 8659) FAX (03) 3411-1026 E-Mail: nomikeiko@kankakuki.go.jp	秘書
経理事務担当	薄根芳彦	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 (内 2122) FAX : 03-3411-0366 E-Mail : yusune i@ntmc.hosp.go.jp	事務員

# 目 次

## I. 総括研究報告

緑内障の **multiple rare variants** の発見と病態機序の解明による予防・治療法の開発

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
溝田 淳	帝京大学医学部眼科
木村 至	順天堂大学医学部眼科
谷戸 正樹	島根大学医学部眼科
渡辺すみ子	東京大学医科学研究所
原 英彰	岐阜薬科大学薬効解析学研究室

## II. 研究成果の刊行物・別刷

# I. 総括研究報告

平成23年度 厚生省科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
総括研究報告書

緑内障のmultiple rare variantsの発見と病態機序の解明による予防・治療法の開発

研究代表者 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

研究要旨：緑内障は40歳以上で約5.0%、70歳以上では14%と日本人では高い有病率で発症する疾患である。本研究は common disease rare variants 仮説にもとづき、日本人における家族性の緑内障家系を複数収集し、原因遺伝子を次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析によって解明する。解明された遺伝子群の遺伝子多型について一般的な緑内障患者に対して解析を行い、疾患との相関を解析する。

分担研究者：溝田淳・帝京大学医学部眼科教授、木村至・順天堂大学眼科准教授、谷戸正樹・島根大学眼科講師、渡辺すみ子・東京大学医科学研究所特任教授、原英彰・岐阜薬科大学薬効解析学研究室教授

実験によって阻害薬を選別して、根本的な予防・治療法を実現することを目的とする。各家系は異なる遺伝子変異によって発症していると考えられ、各遺伝子変異について網膜細胞、ノックアウト・ゼブラフィッシュ、ノックイン・マウス、トランスジェニック・マウスモセットを作製して薬効試験を行う。

#### A. 研究目的

緑内障の有病率は40歳以上で約5.0%、70歳以上では14%と高い割合である（多治見スタディー）。障緑内障による失明率も眼疾患全体で男性が24.5%、女性が31.1%（日本における視覚障害の社会的コスト、日本の眼科疾患の中では最も高い割合となっている。緑内障の早期診断法として遺伝子診断は不可欠な方法の一つであり、これまでにミオシリン（MYOC）、オプチニューリン（OPTN）、WDR36の緑内障遺伝子が報告されたが、日本人では少数の患者で遺伝子変異が発見されている。また common disease common variants 仮説にもとづいて全ゲノム相関解析がアイスランド、米国、豪国、印度、日本で合計数千人の規模で行われたが、オッズ比の高い遺伝子多型は報告されていない。

このような解析結果は緑内障に限らず他の疾患でも報告されており、その対応として近年世界的に common variants を追求するのではなく、rare variants の組み合わせで common disease を説明する方法が実践されている（Huyghe, Eur J Hum Genet 2009, Schork, Curr Opin Genet Dev 2009, Kallio, Hum Mol Genet 2009 etc）。本研究はこれまでの遺伝子解析の方法を改め、multiple rare variants 仮説にもとづいて、家族歴の強い緑内障を対象に、最新の連鎖解析法（SNP HiTLink法）や患者個々のゲノム中の全エクソンを解読するエクソーム配列解析によって、原因遺伝子を解明し、これらの遺伝子変異の組み合わせで大多数の緑内障患者の発症機序を解明し、細胞、動物

#### B. 研究方法

##### 1) 緑内障家系の症例情報及び血液試料の収集

家族歴の強い緑内障（正常眼圧、開放隅角）の6家系（健常家族を含めて10名）について、家族構成員を検査し、症例情報と血液試料の収集を行った。6家系で検体が集まり、既知の緑内障遺伝子（MYOC、OPTN、WDR36など）の遺伝子解析を行い、これらに遺伝子変異がないことを確認した。

##### 2) 緑内障家系における multiple rare variants の探索

収集されたDNA検体からゲノム中の全エクソンを抽出するために最も効率の良いエクソン抽出キットを選別するために Illumina TruSeq, Agilent SureSelect, Roche NimbleGen SeqCap のそれぞれのキットをためした。その結果、SureSelect を用いることになった。次世代シーケンサーは Illumina HiSeq 2000 を用いて塩基配列を解読した。エクソンのリード数が平均75回まで読み込み、エクソン配列はレファレンスゲノム配列にマッピングされて全エクソン配列を決定する。エクソン配列は dbSNP データベースや健常者の得くそ一無各エクソン配列は患者と健常者の間で比較され、1家系について原因遺伝子変異を1つにまで絞り込んだ（平成24年第116回日本眼科学会で発表）。

##### 3) 緑内障 rare variants による発症機序の

## 解明と創薬開発

各家系で発見された遺伝子変異 (rare variant) は他家系とは異なると予測される。個々の rare variant は患者間の浸透率 (遺伝性) が高く、生体機能への影響も強いと考えられる。遺伝子の種類によってのアプローチが異なるが、網膜視神経細胞、網膜グリア細胞での遺伝子変異体の強制発現や遺伝子ノックダウンを行い、質量分析計を用いた細胞のプロテオーム (細胞全タンパク質) 解析や遺伝子発現 DNA チップを用いたトランスクリプトーム (mRNA) 解析によって、発症経路を予測する。その経路を阻害する薬を選別し、細胞実験によって遺伝子変異の影響を改善できるか検討を行う。この細胞実験の結果を踏まえ、モデル動物を用いた薬効試験を行う。

### 4) 緑内障 multiple rare variants を強制発現するマウス、マーモセットの作製と網膜生理機能解析

我々はこれまでに緑内障遺伝子変異 optineurin および WDR36 について、網膜神経節細胞やマウスでの強制発現によって網膜細胞に特異的な障害を発生させ病態機序を解明した経験がある (Chi et al, Hum Mol Genet 2010)。今回同様な方法を用いて個々の rare variant を同時に強制発現するトランスジェニック・マウス、あるいはノックイン・マウスを作製し、日本人の緑内障をマウスで再現する。また、予算的な余裕があれば、(財) 実験動物中央研究において、トランスジェニック・マーモセットを作製したいと考えている (Sasaki et al, Nature 2009)。マーモセットは新世界サルに属し、その網膜構造は神経乳頭、黄斑にいたるまで、きわめてヒトに類似している。

### 5) PET (陽電子放射断層撮影装置) による網膜、視神経、視覚路 (外側膝状体、上丘) および視覚野の形態学的な変化の検討

PET (トレーサー:  $^{18}\text{F}$ -deoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ FDG)) を用いて脳代謝イメージングを行い、脳神経細胞の活動レベルを経時的に可視化する。また、Diffusion MRI (Magnetic Resonance Imaging: 磁気共鳴画像診断法) を用いて視神経線維層の変動を経時的に可視化する。遺伝子変異によって脳の視覚路及び視覚野がどのような影響を受けるかについて明らかにする。また、電気生理学的な視機能測定、共焦点レーザー走査型眼底検査装置とスペクトラルドメイン光干渉断層計 (ハイデルベルグ社スペ

クトラリス) を用いて神経乳頭の3次元構造、神経線維や血管、神経網膜細胞の状態を詳しく解析し、ヒト緑内障患者の早期診断の基礎データとする。

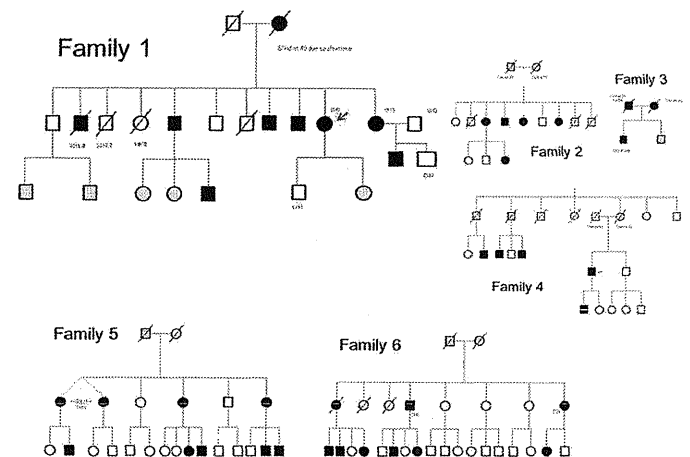
### 6) 早期発見と発症機序の解明による予防・治療法の開発

(3) の研究によって明らかにされる阻害薬を動物モデルに投与して、改善あるいは発症の遅延が可能か検討を行う。薬効が確認された場合はとだちに特許出願を行い、国内製薬会社との共同研究を開始する。

## C. 研究結果

### 1) 緑内障家系の症例情報及び血液試料の収集

家族歴の強い緑内障 (正常眼圧、開放隅角) の6家系 (健常家族を含めて10名) について、家族員を検査し、症例情報と血液試料の収集を行っている。すでに6家系から検体を集め、少なくとも各家系より1名はエクソーム解析が終了している。各家系は既知の緑内障遺伝子には変異がないことを確認した MYOC、OPTN、WDR36 など)。



### 2) 緑内障家系における multiple rare variants の探索

収集された DNA 検体からゲノム中の全エクソンを抽出し (Agilent SureSelect V4, V4+UTR)、次世代シーケンサー (HiSeq2000, Illumina) によって塩基破綻を解読し、レファレンスゲノム配列に対してマッピングした。エクソンのリード数は平均で75に達しており、エクソン配列を決定した。家系1についてはエクソン配列は dbSNP データベースなどと比較し、健常者に現れない遺伝子変異が1

つに絞り込まれ、日本人のコントロール500人からはこの変異が検出されていない。また、一般的な正常眼圧緑内障患者については150人規模で遺伝子解析が進行中である。緑内障患者の最終的な検体数は300まで収集する予定である(平成24年第116回日本眼科学会で発表)。

### 3) 緑内障 rare variants による発症機序の解明と創薬開発

各家系で発見された遺伝子変異(rare variant)は他家系とは異なると予測される。個々の rare variant は患者間の浸透率(遺伝性)が高く、生体機能への影響も強いと考えられる。遺伝子の種類によっての研究のアプローチが異なるが、網膜視神経細胞、網膜グリア細胞での遺伝子変異体の強制発現や遺伝子ノックダウンを行い、質量分析計を用いた細胞のプロテオーム(細胞全タンパク質)解析や遺伝子発現 DNA チップを用いたトランスクリプトーム(mRNA)解析によって、発症経路を予測する。その経路を阻害する薬を選別し、細胞実験によって遺伝子変異の影響を改善できるか検討を行う。この細胞実験の結果を踏まえ、モデル動物を用いた薬効試験を行う。

### 4) 緑内障 multiple rare variants を強制発現するマウス、マーモセットの作製と網膜生理機能解析

我々はこれまでに緑内障遺伝子変異 optineurin (E50K 変異)および WDR36(D658G 変異)について、網膜神経節細胞やマウスでの強制発現によって網膜細胞に特異的な障害を発生させ病態機序を解明した(Chi et al, Hum Mol Genet 2010)。今回同様な方法を用いて個々の rare variant を同時に強制発現するトランスジェニック・マウス、あるいはノックイン・マウスを作製し、日本人の緑内障をマウスで再現する。

### 5) PET による網膜、視神経、視覚路および視覚野の形態学的な変化の検討

モデル動物作成後、PET(トレーサー: 18F-deoxyglucose (18FDG))を用いて脳代謝イメージングを行い、脳神経細胞の活動レベルを経時的に可視化する。また、Diffusion MRI (Magnetic Resonance Imaging: 磁気共鳴画像診断法)を用いて視神経線維層の変動を経時的に可視化する。遺伝子変異によって脳の視覚路及び視覚野がどのような影響を受けるかについて明らかにする。また、電気生理

学的な視機能測定、共焦点レーザー走査型眼底検査装置とスペクトラルドメイン光干渉断層計(ハイデルベルグ社スペクトラリス)を用いて神経乳頭の3次元的構造、神経線維や血管、神経網膜細胞の状態を詳しく解析し、ヒト緑内障患者の早期診断の基礎データとする。

### 6) 早期発見と発症機序の解明による予防・治療法の開発

本研究によって明らかにされる阻害薬を動物モデルに投与して、予防あるいは改善の可能性を検討する。

## D. 考察

緑内障は視覚障害者の約25%を占める眼疾患であり、日本では失明率が最も高い眼疾患である。緑内障は複数の病態に分類されが、何れについても根本的な治療法はまだ存在しない。緑内障は複数の遺伝因子と環境因子によって発症する多因子疾患と考えられるが、早期診断を目的とした遺伝子探索が世界中で行われてきた。Common disease common variants 仮説(頻度の高い病気では家系が異なっても同じ遺伝子が関わって発症すると考える説)にもとづき、多数の患者で相関する遺伝子多型 common variants の探索が世界各地で数千人規模の全ゲノム相関解析による感受性遺伝子の探索が行われたが、未だ追試可能な遺伝子は報告されていない。最近発表された緑内障感受性遺伝子に関する論文(Nakano et al, PNAS 2009)についても、我々を含む複数のグループを検証したが(Rao et al, PNAS 2009)、再現性は得られていない。我々が独自に実施した緑内障、加齢黄斑変性、ポリープ状脈絡膜血管症の全ゲノム相関解析では、後者2つの病気について染色体10番の ARMS2/HTRA1 領域に p 値  $10^{-14}$  から  $10^{-8}$  の強い相関が発見されたが(Goto et al, JOBDI 2009)、緑内障ではこのような相関は得られていない。このような結果の背景として、common disease common variants 仮説にもとづく従来の相関解析では、頻度は高いものの、遺伝性に乏しく、機能障害はきわめて小さいと考えられる。近年 common disease multiple rare variants 仮説(ありふれた疾患相違変異仮説、頻度の高い病気でも家系が異なると発症に関わる遺伝子も異なると考える説)が世界的に提唱されており(Li et al, Am J Hum Genet 2008)。この仮説では、出現頻度は低いものの、



病態機序に与えるインパクトの大きい rare variant (遺伝子変異)が複数個組み合わさって、common disease を発症させるという考え方である。本研究では日本人の緑内障小家系を対象とした初めての緑内障 multiple rare variants の探索を行い、オッズ比が高く、機能障害をもたらす遺伝子変異を発見し、その組み合わせで早期診断と予防・治療法を開発する。

#### E. 結論

本研究が目的とする緑内障の multiple rare variants の探索によって個々の緑内障患者の発症原因となりうる遺伝性の強い遺伝子変異が発見される可能性がある。これらの rare variants は common variants とは異なり、機能障害をもたらす可能性が高く、細胞や動物実験によってこれを検証することができる。緑内障は複数の rare variant が異なる組み合わせで発症していると考えられ、個々の患者の rare variant の種類を確定することによって、障害の種類や程度を予測することができる。我々は optineurin と WDR36 の rare variants をマウスで強制発現したところ、網膜特異的な機能障害が観察されており、common variant のように統計学的な優位性にとどまらず、発症機序や創薬にも利用できる具体性のある情報が得られると期待している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

Shen X, Ying H, Qiu Y, Park J-S, Shyam R, Chi Z-L, Iwata T, Yue BYJT. Processing of optineurin in neuronal cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2011;286:3618-29

Kabuto T, Takahashi H, Goto-Fukuura Y, Igarashi T, Akahori M, Kameya S, Iwata T, Mizota A, Yamaki K, Miyake Y, Takahashi H. *Molecular Vision* 2012;18:1031-9

Hara K, Akahori M, Tanito M, Kaidzu S, Ohira A, Iwata T. Analysis of LOXL1 gene variants in Japanese patients with branch retinal vein occlusion. *Molecular Vision*

2011;17:3309-13

Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. Clinical characteristics of occult macular dystrophy in a large family with mutation of RP1L1 gene. *Retina* 2012; Mar 29 epub

Fujinami K, Akahori M, Fukui M, Tsunoda K, Iwata T, Miyake Y. Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. *Acta Ophthalmologica* 2011;89(3):e297-8. doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01848.x

Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hirami Y, Iwata T, Takahashi M. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2011;6(2):e17084

##### 書籍

岩田岳、「眼科と補体」、『補体への招待』木下タロウ編、189-193、メディカルビュー社 (2011)

岩田 岳、「視力・資格を司る黄斑の生理機能と黄斑変性の分子メカニズム」、『実験医学』、加我君孝編、526-532、羊土社 (2011)

##### 学会発表

第115回日本眼科学会 (東京、2011年5月) 小林宏明、岡本はる、池在龍、村上晶、岩田岳、黄斑変性カニクイザルにおける血漿プロテオーム解析

Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Usui T, Hatase T, Nakamura M, Ohde H, Itabashi T, Okamoto H, Takada Y, and Iwata T. Dominant mutations in RP1L1 are responsible for occult macular dystrophy. *ARVO* (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Chi Z, Katakai Y, Shimozawa N, Suzuki MT, Iwata T. Microarray analysis of RPE cells isolated from cynomolgus monkey with early-onset drusen formation. ARVO (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Kobasyashi H, Okamoto H, Chi Z, Murakami A, Iwata T. Plasma proteome analysis on cynomolgus monkey pedigrees with early onset drusen formation. ARVO (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Iwata T, Chi Z, Yoshida T, Fujinami K, Miyake Y, Mizota A, Katakai Y, Suzuki MT, Shimozawa N, Yoshikawa Y, Lambris JD. Inhibition of drusen formation by Compstatin in cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. 5th International Complement Therapeutics Conference, Aegean Conferences (Rhodes, Greece, June 2011)

Iwata T, Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Usui T, Hatase T, Nakamura M, Ohde H. Dominant mutations in RP1L1 are responsible for occult macular dystrophy (Miyake's Disease). ASHG (Montreal, Canada, October 2011)

#### 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（平成20-21年度）  
なし
3. その他  
なし


## II. 研究成果の刊行物・別刷

EXPERIMENTAL MEDICINE

# 実験医学

月刊

別刷

 羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1

TEL : 03-5282-1211 (代表) FAX : 03-5282-1212

E-mail : eigyo@yodosha.co.jp

URL : <http://www.yodosha.co.jp/>

# 視力・色覚を司る黄斑の生理機能と黄斑変性の分子メカニズム

岩田 岳

ヒトは情報の8割を視覚に依存すると考えられており、眼は重要な感覚器官である。眼の中でも特に網膜の中心に位置して視細胞が高い密度で存在する黄斑は視力と色覚を司る重要な部位である。黄斑には周辺網膜に存在する視神経や毛細血管がなく、凹型構造となって視細胞が網膜表面に近づくことにより、感度がより高くなっている。この特殊な構造こそが、逆に組織的な脆弱性を生み、多くの黄斑疾患の病巣となっている。

キーワード 網膜, 黄斑, 視細胞, 中心窩, 加齢黄斑変性, オカルト黄斑ジストロフィー

## はじめに

角膜、水晶体、そして硝子体を通過した光は網膜に結像するが、光を感じる視細胞は網膜内に均一に存在するわけではなく、黄斑に集中している(図1A)。黄斑の中心には感度は低い色覚を司る錐体細胞(cone)が集中し、そのすぐ周辺には色覚はないが感度の高い桿体細胞(rod)が取り巻く。黄斑疾患には浮腫、剥離、嚢腫、萎縮、変性などのさまざまな障害の形態があり、複数の要因によって発症するが、そのなかでも世界的に有病率の高い難治性疾患(厚生労働省認定)として加齢黄斑変性(age-related macular degeneration)がある。米国では中途失明の原因として第1位であり、日本でも急速な高齢化によって患者数が増加している。加齢黄斑変性は遺伝子、加齢、喫煙、肥満、青色光など複数の要因によって発症することが疫学調査によって明らかにされており、この10年間に発症機序が徐々に明らかになってきた。さらに、黄斑の変性症としては強い近視に起きやすい新生血管黄斑症、若

年層にも起きる突発性脈絡膜新生血管、そして遺伝的要因のみで発症する黄斑ジストロフィー(先天性黄斑変性)がある。本稿ではこれらの黄斑変性症のなかでも多因子疾患の加齢黄斑変性と、黄斑部の錐体機能のみが著しく低下するメンデル遺伝形式の黄斑ジストロフィー(macular dystrophy)の一種であるオカルト黄斑ジストロフィー(occult macular dystrophy: 三宅病)の原因遺伝子解明についてご紹介する。

## 黄斑部の組織構造と環境

厚さわずか0.1~0.3 mmの網膜は感覚網膜9層と網膜色素上皮細胞から構成され、感覚網膜には神経細胞の視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞に加えて、グリア系細胞と血管系細胞が存在する。検眼鏡的には黄斑は視神経乳頭の中心から4 mm耳側に位置し、直径1.5~2.0 mmの黄色を呈する円周を指し、この中心の直径約0.35 mm(中心窩)は神経節細胞や内顆粒層が周囲に移動して浅く陥凹し、

## Visual function of the macula and molecular mechanism of the macular diseases

Takeshi Iwata: Division of Molecular & Cellular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center [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)分子細胞生物学研究部]

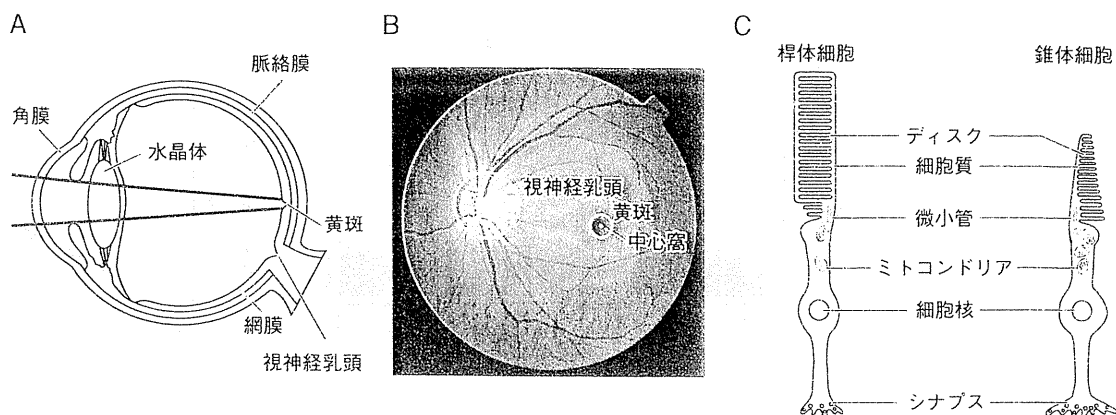


図1 眼球の構造と視細胞

A) 角膜と水晶体を通過した光は黄斑で焦点を結ぶ。B) ヒトの眼底像。C) 視細胞（桿体細胞と錐体細胞）の構造。円盤状のディスク上に桿体細胞ではロドプシン、錐体細胞では赤、緑、青のいずれかのオプシンが存在する。中心窩では主に赤と緑のオプシンを発現する錐体細胞が集中して存在し、少し外れると桿体細胞数が顕著に増加する

無血管な領域であり、錐体細胞のみが網膜の表面に位置する構造になっている（図1 B, C）。黄斑は魚類にはじまり、爬虫類、鳥類へと受け継がれたが、哺乳類の登場時にはいったん消失し、霊長類で再現したことが知られている。霊長類の周辺網膜では神経節細胞－双曲細胞－視細胞のシナプス様式は1：多：多々となっているのに対し、中心小窩（中心窩の中央部分）では1：1：1となっており、ここでは最高の視力が確保されるが、少しでも中心小窩からずれると急激に視力は低下する。錐体細胞は桿体細胞に比べて細胞当たりのエネルギー代謝が約8倍異なり、ミトコンドリアの数も細胞当たりでは20倍も異なることが知られている<sup>1)</sup>。すなわち黄斑の中心は無血管でありながら活発に代謝・機能を維持しなければならない環境になっており、栄養や酸素の供給が不足すると容易に機能が低下する危険性がある。

### 加齢黄斑変性と全ゲノム相関解析

視細胞では、その生理機能を維持するために血管の豊富な脈絡膜との間で酸素、栄養素、老廃物の交換が盛んに行われている。網膜色素上皮細胞は視細胞と脈絡膜の間を隔てるように位置し、分子輸送や視細胞の貪食作用、そして各種生体因子の分泌機能などによっ

て網膜の恒常性を維持している。網膜色素上皮細胞の老化によってこれらの機能が低下すると細胞内に細胞毒性のあるリポフスチンや基底膜側に黄色のドルーゼン<sup>2)</sup>が蓄積する。これらの蓄積はやがて網膜色素上皮細胞の萎縮（萎縮型加齢黄斑変性）や黄斑部における血管新生（滲出型加齢黄斑変性）となって、視細胞が障害され、中心視力が著しく低下する。

近年、遺伝子多型（SNP）チップを用いた多因子疾患の全ゲノム相関解析（genome wide association study：GWAS）が盛んに行われているが、加齢黄斑変性はその最初の成功例である。アメリカ人患者を対象にしたマイクロサテライトマーカーによる全ゲノム相関解析において強い相関のあった領域については、SNPチップによって染色体1番に存在する補体H因子の遺伝子多型が疾患と強く相関することが報告された<sup>2)3)</sup>。このなかでも特にH因子のY402H（rs1061170）の遺伝子多型は白人、ヨーロッパ系インド人において多くの患者について相関したのに対して、日本人や中国人ではY402Hの相関は観察されず、I62V（rs800292）が一部の患者で相関する程度であった<sup>4)5)</sup>。今後の他のアジア人

#### ※1 ドルーゼン

ブルッフ環<sup>6)</sup>と網膜色素上皮細胞の間に蓄積する黄色あるいは白色の物質。その構成成分は脂質、補体、アミロイド、クリスタリンなど多岐にわたる

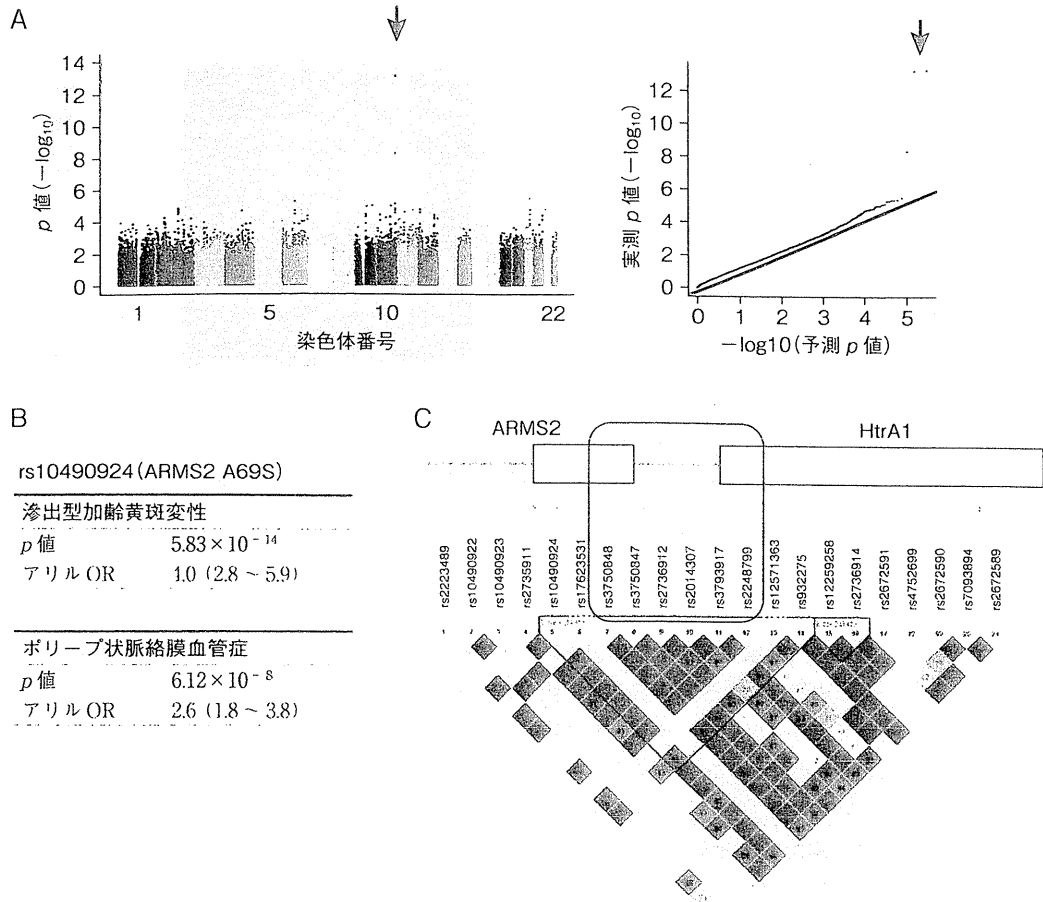


図2 日本人滲出型加齢黄斑変性の全ゲノム相関解析

A) 全ゲノム相関解析によって染色体 10 番に強い相関が観察された (→)。 B) この領域のタグ SNP rs10490924 の加齢黄斑変性およびポリープ状脈絡膜血管症における  $p$  値とオッズ比 (OR) C) rs10490924 と連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) を共有する領域は ARMS2 から HtrA1 の 2 遺伝子にまたがり、いずれの遺伝子が疾患に関与するのか研究されている (A は文献 9 より転載)

### ※2 補体副経路

副経路は病原体表面で直接 C3 の分解が行われることで開始する補体活性経路の 1 つ。肝臓でつくられた C3 は血液中で C3a と C3b に分解される。C3b は病原体の細胞膜に結合し、これに B 因子が結合する。さらにこの複合体は D 因子によって分解され、Ba および C3 転換酵素 Bb となる。C3bBb 複合体は C3 をさらに C3a と C3b に分解し、病原体表面の C3bBb は増加する。C3b 複合体は C3bBbC3b となり、これは C5 を C5a と C5b に分解し、C5b、C6、C7、C8、C9 からなる複合体は細胞膜障害性複合体 (membrane attack complex, MAC) を形成し、病原体の細胞膜に穴を開け、浸透圧の変化によって細胞を溶解する。H 因子は C3b に結合することで副経路に抑制的に働く。

### ※3 ブルッフ膜

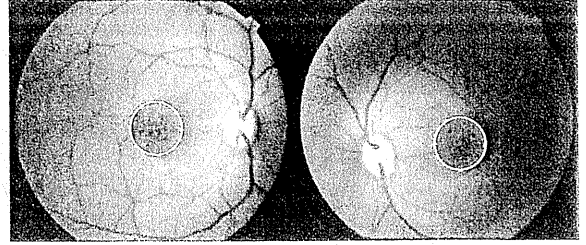
膠原線維を主体とする無細胞性の層構造。網膜色素上皮と脈絡膜が接する。網膜-脈絡膜間の物質交換の通路となっている。

口における H 因子の遺伝子多型解析が注目されている。Y402H は H 因子の反復配列 (short consensus repeats: SCRs) の 7 番目にあり、C3b、C 反応性タンパク質 (C-reactive protein)、グリコサミノグリカンとの結合部位に位置し、補体副経路<sup>2)</sup>の制御に影響すると考えられる。H 因子のノックアウトマウス (*cfh*<sup>-/-</sup>) は視細胞の障害、網膜における C3 の蓄積、ブルッフ膜の菲薄化が観察されている<sup>6)</sup>。さらに、染色体 10 番では LOC387715/ARMS2 (age-related maculopathy susceptibility 2) と HtrA1 (HtrA serine peptidase 1)

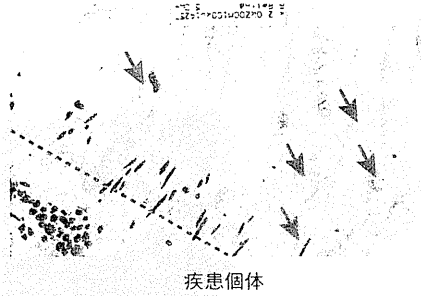
A 全身麻酔下における眼底撮影



B 両眼に観察される黄斑部のドルーゼン



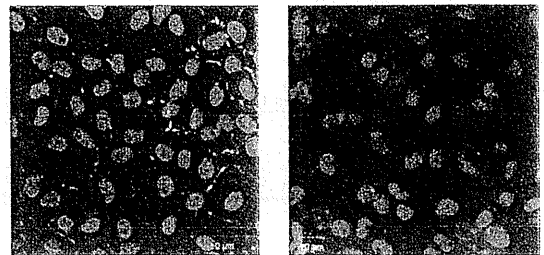
C 未消化視細胞外節



疾患個体

D

網膜色素上皮細胞 ZO-1 染色



正常個体

疾患個体

図3 黄斑変性カニクイザルの病理学的解析

A) 全身麻酔下における眼底撮影 (医薬基盤研究所霊長類科学研究センター)。B) 疾患個体の眼底像。黄斑部に黄色のドルーゼンが集中して存在する。C) 疾患サルの網膜と網膜色素上皮細胞との境界 (-----) を撮影した電子顕微鏡写真。網膜色素上皮細胞の貪食作用の機能低下によって未消化の桿体細胞 (→) 外節が観察された。D) 正常個体と疾患個体の網膜色素上皮細胞の細胞接着機能の観察。ZO-1 染色 (緑) によって疾患サルの細胞では接着機能が破綻していることが観察された。青は細胞核 (DAPI 染色)

遺伝子領域における遺伝子多型が強く相関した<sup>7)</sup>。われわれは日本人に多くみられる滲出型黄斑変性のみを集め、独自に全ゲノム相関解析を行ったところ、染色体1番のCFH領域は相関せず、染色体10番のLOC387715/ARMS2のみが相関することを明らかにした(図2)<sup>8)9)</sup>。この領域に存在する2つの遺伝子の片方/両方が加齢黄斑変性のリスクを高めるのか、現時点では明らかにされていない。LOC387715/ARMS2遺伝子はマウスには存在せず、ヒトLOC387715/ARMS2を発現するトランスジェニックマウスを作製したところ血管新生に関する抑制効果が観察されている。また、HtrA1のノックアウトマウスでは高齢でも網膜の形態的な異常は観察されていない。加齢黄斑変性は多因子疾患であることから、その再現にはこれらのマウスに環境的なストレスを加える必要があり、現在実験が行われている。

### 黄斑変性霊長類モデルの解析

ドルーゼンの蓄積が黄斑を中心に広範囲に及ぶと、これに接する網膜色素上皮細胞は徐々に萎縮し、黄斑部の視細胞も障害されて萎縮型加齢黄斑変性となる。これは脈絡膜から視細胞に向かって黄斑部で血管新生が起こる滲出型加齢黄斑変性と区別される。萎縮型は白人での頻度が高く、滲出型は日本人に多いことが知られている。ドルーゼンの生成メカニズムはまだ十分に解明されていないが、遺伝子多型、視細胞を保護する不飽和脂質(DHA)の光酸化分子に対する自己抗体<sup>10)</sup>、アミロイドβの蓄積による補体活性化<sup>11)</sup>、サイトメガロウイルス感染による炎症<sup>12)13)</sup>、ケモカインの亢進や補体の活性化<sup>14)~16)</sup>など複数の原因が考えられている。このなかでも特に、ドルーゼンや網膜色素上皮細胞に補体の活性化が確認されており、患者の網膜切片の免



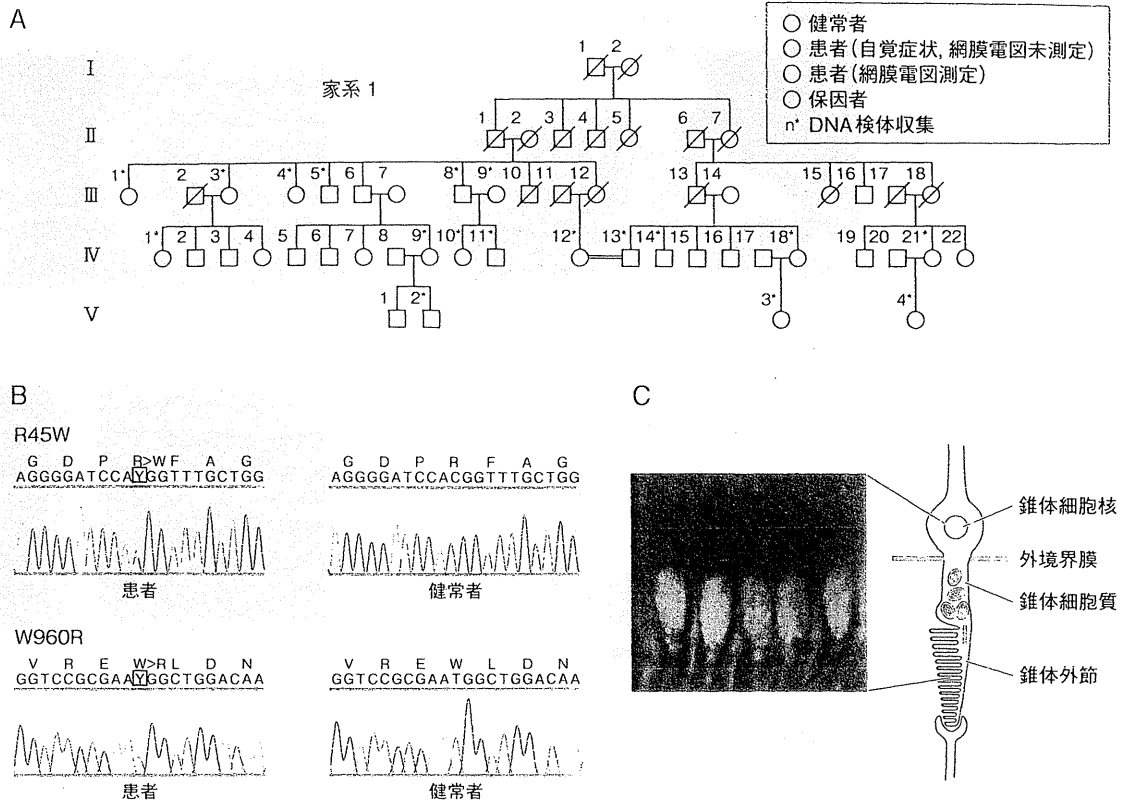


図4 オカルト黄斑ジストロフィーと *RP1L1* 遺伝子

A) オカルト黄斑ジストロフィーの家系 この優性遺伝の家系を用いて SNP HiTLink連鎖解析法を行い、8番染色体短腕に連鎖領域がマッピングされた。B) 患者に観察された *RP1L1* R45WとW960R遺伝子変異 2つの変異はコントロール876人では検出されなかった。C) *RP1L1*の免疫染色(緑)。 *RP1L1*のN末端に対して作製された抗体を用いて行われた視細胞の外境界膜から外節にかけて染色された。赤はロドプシンの免疫染色。桿体細胞の外節が染色されている

疫染色によって補体関連分子の陽性反応が観察されている。萎縮型の患者の一部は滲出型へ移行することが知られているが、その詳細なメカニズムは不明のままである。前述のように、加齢黄斑変性リスク因子として、遺伝子、加齢に加えて、喫煙、肥満、青色光などが知られている。

さて、以上の事実から補体の活性化を抑制することによって、加齢黄斑変性を治療することが考えられ、多くの補体抑制薬について臨床試験でその薬効が評価されている。黄斑は一部の霊長類と鳥類にしか存在しないために、厳密には一般的な実験動物(マウス、ラット、モルモット)では黄斑に関する実験はできない。そこでわれわれ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との共同研究によって、若年で患者と同成分のドルーゼンを生成する遺伝性の黄斑変性カニクイザルを解析している(図3)<sup>17)</sup>。この疾患サルにおいて、ヒトと同様にドルーゼンや網膜色素上皮細胞において補体の活性化が観察されている<sup>18) 19)</sup>。われわれは補体を抑制することによってドルーゼンの生成を抑制あるいは消滅できるか、C3b抑制薬(Compstatin, John Lambrisによって開発)およびC5b抑制薬(AcPepA, 岡田秀親によって開発)の効果を研究中である。先行しているCompstatinについては実験に用いた4頭全頭について、一部のドルーゼンについて消失していく様子が観察された<sup>20)</sup>。

## オカルト黄斑ジストロフィーの原因遺伝子

オカルト黄斑ジストロフィーは日本人によって発見された数少ない眼疾患の1つであり、黄斑部の錐体細胞のみが障害される病気である<sup>21) 22)</sup>。われわれは佐渡で発見されたオカルト黄斑ジストロフィーの大家系を調査し(図4A)、SNPチップを用いた新しい連鎖解析法(SNP HiTLink、福田陽子と辻省次によって開発)<sup>23)</sup>を用いて解析を行った。その結果、染色体8番短腕にLOD Score 3.7以上の高い連鎖が発見された。連鎖不平衡のrs265309からrs263841までの約10 Mbの領域には少なくとも128遺伝子が存在し、このなかから網膜での発現が確認された22の遺伝子が抽出された。さらに、各遺伝子の文献による情報から4つの候補、*MSRA* (methionine sulfoxide reductase A)、*GATA4* (GATA binding 4)、*PCMI* (pericentriolar material 1)、そして*RP1L1* (RP1-like 1) が選択され、これらのダイレクトシーケンスを行った。その結果、*RP1L1*にR45Wの遺伝子変異が発見され、他2つのオカルト黄斑ジストロフィー家系においても同じ変異が発見された。さらに1家系においてW960R変異が発見された(図4B)<sup>24)</sup>。

*RP1L1*は網膜色素変性の原因遺伝子*RP1*に類似する遺伝子としてクローニングされ、多くの患者がスクリーニングされたが遺伝子変異は発見されなかった<sup>25) 26)</sup>。*RP1L1*のN末端に対して作製された抗体を用いて免疫染色を行った結果、視細胞の微小管に特異的な染色が観察された(図4C)。この結果はマウスで行われた同様な染色と類似する結果である<sup>27)</sup>。視細胞の微小管は高度に分化しており、細胞体と外節の間の輸送機能を担うと同時に視細胞を光軸に沿って細胞の傾きを修正する機能がある<sup>28)</sup>。R45WおよびW960Rの遺伝子変異によってこの機能が阻害されると、中心窩の錐体細胞は光軸に対して斜め方向に傾き、感光性は著しく低下する可能性がある。また、錐体細胞はエネルギー消費量が桿体細胞に比べて大きいことから、変異によって微小管の機能が阻害され、細胞輸送が最も盛んな中心窩において、錐体細胞が機能できない状態になっている可能性もある。今後の基礎研究の結果が期待される。

## おわりに

黄斑変性のなかから多因子疾患の加齢黄斑変性とメンデル遺伝のオカルト黄斑ジストロフィーを対比しながらご紹介した。関連解析によって得られた感受性遺伝子は環境因子や習慣因子などの影響を受けるために、遺伝子だけの研究では答えが得られない可能性がある。われわれは喫煙、肥満、青色光などのストレスによる影響をこれらのトランスジェニック・ノックアウトマウスを使って検証している。またオカルト黄斑ジストロフィーにおける*RP1L1*変異との整合性について、中心窩と周辺部の錐体細胞の構造や光軸に対する傾きの補正について、さらにエネルギー消費量の比較について検討している。加齢黄斑変性とオカルト黄斑ジストロフィーは全く発症機序の異なる疾患であるが、黄斑部の特殊な凹型構造に由来することについては共通している。進化によって、より集光性と感度が高められた結果、逆にストレスに対して脆弱になり、多くの黄斑疾患を伴うようになったと考えられる。黄斑は視覚のなかでも最も重要な部位であり、今後の研究の進展が期待されている。

## 文献

- 1) Hoang, Q. V. et al. *Vis. Neurosci.* 19 : 395-407, 2002
- 2) Klein, R. J. et al. *Science*, 308 : 385-389, 2005
- 3) Hageman, G. S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 : 7227-7232, 2005
- 4) Okamoto, H. et al. : *Mol. Vis.*, 12 : 156-158, 2006
- 5) Gotoh, N. et al. *Hum. Genet.*, 120 : 139-143, 2006
- 6) Pickering, M. C. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 : 9649-9654, 2006
- 7) Dewan, A. et al. : *Science*, 314 : 989-992, 2006
- 8) Yoshida, T. et al. : *Mol. Vis.*, 13 : 545-548, 2007
- 9) Goto, A. et al. : *J. Ocul. Biol. Dis. Infor.*, 2 : 164-175, 2009
- 10) Hollyfield, J. G. et al. : *Nature Med.*, 14 : 194-198, 2008
- 11) Yoshida, T. et al. : *J. Clin. Invest.*, 115 : 2793-2800, 2005
- 12) Vannas, M. et al. : *Eye Ear Nose Throat. Mon.* : 50 : 189-194, 1971
- 13) Miller, D. M. et al. : *Am. J. Ophthalmol.*, 138 : 323-328, 2004
- 14) Ambati, J. et al. : *Nature Med.*, 9 : 1390-1397, 2003
- 15) Nozaki, M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 : 2328-2333, 2006
- 16) Takeda, A. et al. : *Nature*, 460 : 225-230, 2009
- 17) Suzuki, M. T. et al. : *Primates*, 44 : 291-294, 2003
- 18) Umeda, S. et al. : *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46 : 683-691, 2005
- 19) Umeda, S. et al. *FASEB J.*, 46 : 1683-1685, 2005

- 20) Chi, Z. et al. Adv. Exp. Med. Biol., 703 : 127-135, 2010
- 21) Miyake, Y. et al. Am. J. Ophthal., 108 : 292-299, 1989
- 22) Miyake, Y. et al. Am. J. Ophthal., 122 : 644-653, 1996
- 23) Fukuda, Y. et al. BMC Bioinformatics, 10 : 121, 2009
- 24) Akahori, M. et al. Am. J. Hum. Genet., 87 : 424-429, 2010
- 25) Conte, I. et al. Europ. J. Hum. Genet., 11 : 155-162, 2003
- 26) Bowne, S. J. et al. Mol. Vis., 9 : 129-137, 2003
- 27) Yamashita, T. et al. J. Neurosci., 29 : 9748-9760, 2009
- 28) Eckmiller, M. S. Prog. Retin. Eye Res., 23 : 495-522, 2004

参考図書

『An introduction to the biology of vision』(James T. McIlwain/編), Cambridge University Press, 1996  
 『The first steps in seeing』(Robert W. Rodieck/著), Sinauer Associates, 1998  
 『Animal eyes』(Michael F. Land & Dan-Eric Nilsson/著), Oxford University Press, 2002  
 『Visual perception, A clinical orientation 4<sup>th</sup> Ed』(Steven H. Schwartz/著), McGraw-Hill Medical, 2010

Profile


著者プロフィール

岩田 岳：1983年，名城大学農学部農芸化学科卒業，'88年，同大学院農学研究科卒業，農学博士 '88～'89年，米国国立衛生研究所(NIH)／国立眼研究所(NEI) 研究員，'89年，マイアミ大学バスコンバルマー眼研究所研究員，'91年，米国国立衛生研究所(NIH)／国立眼研究所(NEI) 研究員，'99年，国立病院東京医療センター臨床研究部主任研究員，2005年，独立行政法人国立病院機構東京医療センター感覚器センター(NISO) 室長，'07年，独立行政法人国立病院機構東京医療センター感覚器センター(NISO) 分子細胞生物学研究部部長，現在に至る。

Book Information

# 基礎から学ぶ 生物学・細胞生物学 第2版

著／和田 勝



- ◆ 高校で生物を習っていない学生にも最適な入門書
- ◆ 各章の内容が一目でわかる「概略図」など，イメージしやすい図表が満載
- ◆ 今回の改訂では，章末問題や最新の話題のコラムを新たに追加

多数の採用実績をもつ好評教科書が改訂！

定価(本体3,000円+税)  
 2色刷り B5判 317頁  
 ISBN978-4-7581-2018-0

発行 羊土社

## Processing of Optineurin in Neuronal Cells\*

Received for publication, August 16, 2010, and in revised form, November 4, 2010. Published, JBC Papers in Press, November 8, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.175810

Xiang Shen<sup>‡</sup>, Hongyu Ying<sup>‡</sup>, Ye Qiu<sup>‡</sup>, Jeong-Seok Park<sup>‡</sup>, Rajalekshmy Shyam<sup>‡</sup>, Zai-Long Chi<sup>§</sup>, Takeshi Iwata<sup>§</sup>, and Beatrice Y. J. T. Yue<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Ophthalmology and Visual Sciences, College of Medicine, University of Illinois, Chicago, Illinois 60612 and the <sup>§</sup>National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, 152-8902 Tokyo, Japan

Optineurin is a gene linked to amyotrophic lateral sclerosis, Paget disease of bone, and glaucoma, a major blinding disease. Mutations such as E50K were identified in glaucoma patients. We investigated herein the involvement of ubiquitin-proteasome pathway (UPP) and autophagy, two major routes for protein clearance, in processing of optineurin in a retinal ganglion cell model line RGC5 and neuronal PC12 cells. It was found that the endogenous optineurin level in neuronal cells was increased by treatment of proteasomal inhibitor but not by autophagic and lysosomal inhibitors. Multiple bands immunoreactive to anti-ubiquitin were seen in the optineurin pulldown, indicating that optineurin was ubiquitinated. In cells overexpressing wild type and E50K optineurin, the level of the proteasome regulatory  $\beta 5$  subunit (PSMB5, indicative of proteasome activity) was reduced, whereas that for autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 was enhanced compared with controls. Autophagosome formation was detected by electron microscopy. The foci formed after optineurin transfection were increased upon treatment of an autophagic inhibitor but were decreased by treatment of an inducer, rapamycin. Moreover, the level of optineurin-triggered apoptosis was reduced by rapamycin. This study thus provides compelling evidence that in a normal homeostatic situation, the turnover of endogenous optineurin involves mainly UPP. When optineurin is up-regulated or mutated, the UPP function is compromised, and autophagy comes into play. A decreased PSMB5 level and an induced autophagy were also demonstrated *in vivo* in retinal ganglion cells of E50K transgenic mice, validating and making relevant the *in vitro* findings.

Glaucoma is one of the leading causes of irreversible blindness worldwide (1) and is characterized by a progressive loss of retinal ganglion cells (RGCs)<sup>2</sup> and axons and distinctive cupping of the optic nerve head. The most common form of this disease, primary open angle glaucoma, is genetically het-

erogeneous, caused by several susceptibility genes and perhaps also environmental factors (1–4). Currently, a total of 14 chromosomal loci, designated as GLC1A to GLC1N, have been linked to primary open angle glaucoma. Three candidate genes identified so far include myocilin (GLC1A), optineurin (GLC1E), and WD40-repeat36 (GLC1G) (1–3). Among them, optineurin is linked principally to normal pressure or normal tension glaucoma (NTG), a subtype of primary open angle glaucoma (5). Optineurin mutations were noted to vary with ethnic background (6). The E50K mutation, found in Caucasian and Hispanic populations (6), seems to be associated with a more progressive and severe disease in NTG patients (7). Very recently, optineurin has also been linked to amyotrophic lateral sclerosis (8) and Paget disease of bone (9).

The human optineurin gene codes for a 577-amino acid protein that contains multiple coiled-coil domains and a C-terminal zinc finger (10). The optineurin protein from different species has high amino acid homology (11), and the amino acid 50 glutamic acid residue is conserved in mouse, rat, chicken, and cow (12). Optineurin is ubiquitously expressed in nonocular tissues such as the heart and brain (10) and in ocular tissues, including the retina, trabecular meshwork, and nonpigmented ciliary epithelium (9). In the retina, RGCs are immunolabeled with a high intensity (12, 13).

Optineurin shares a 53% amino acid homology with NF- $\kappa$ B essential modulator and was identified as an NF- $\kappa$ B essential modulator-related protein (14). Recently, optineurin has been shown to be a negative regulator of NF- $\kappa$ B (15). Like NF- $\kappa$ B essential modulator, optineurin has a polyubiquitin-binding region in the sequence, and it binds Lys-63 linked polyubiquitinated chains (16). Optineurin has in addition been demonstrated to interact with itself to form homo-hexamers (17). It also interacts with proteins, including myosin VI, Rab8, and transferrin receptor. Super molecular complexes are detected, and granular structures termed foci are formed when optineurin is overexpressed or E50K mutated (17, 18).

Proper processing of cellular proteins is of vital importance. In eukaryotic cells, the ubiquitin-proteasome pathway (UPP) and autophagy are two major routes for protein clearance (19–21). Proteasomes predominantly degrade, in a specific manner, short lived nuclear and cytosolic proteins. The bulk degradation of long lived cytoplasmic proteins or organelles is mediated largely by autophagy. Proteins can also be degraded through the autophagy-independent endosome-lysosome system.

Protein degradation via UPP is a temporally controlled and tightly regulated process that involves covalent linking of a

\* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grants EY018828, EY005628, and EY003890 from NEI (to B. Y. J. T. Y.) and Core Grant EY01792. This work was also supported by Ministry of Health, Labor, and Welfare and Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (to T. I.).

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Dept. of Ophthalmology and Visual Sciences, University of Illinois, 1855 West Taylor St., Chicago, IL 60612. Fax: 312-996-7773; E-mail: beatyue@uic.edu.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: RGC, retinal ganglion cell; DOX, doxycycline; IP, immunoprecipitation; LCT, lactacystin; 3-MA, 3-methyladenine; NTG, normal tension glaucoma; OPTN, optineurin; UPP, ubiquitin-proteasome pathway.