

# 医学のあゆみ

第1土曜特集

# エクソーム解析 — 成果と将来

企画 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学

## 総論

全エクソーム解析における情報処理

日本人の遺伝子リファレンスライブラリーデータベース

次世代シーケンサーによる病因遺伝子の探索と遺伝子診断への応用

遺伝性疾患におけるエクソーム解析の有用性と通称

遺伝性疾患におけるターゲットリシーケンスングの有用性

## 各論：生殖細胞系列変異

成育医療領域における大規模遺伝子解析

常染色体優性遺伝性疾患のエクソーム解析

発育期の精神発達疾患の全エクソーム解析

難聴の遺伝子診断と次世代シーケンス解析

— 保険収載された遺伝子診断からターゲットリシーケンスングとエクソーム解析

全エクソーム解析による長江世網脈管拡張症の原因遺伝子探索

ミトコンドリア呼吸鎖異常症のエクソーム解析

全エクソーム解析による難治性循環器疾患の原因遺伝子の同定

小児血液疾患に対するエクソーム解析

次世代シーケンスングによる先天性内分泌疾患の分子基盤の解明

エクソーム解析による遺伝性筋疾患の効率的遺伝子変異スクリーニング法の開発と新規原因遺伝子同定

エクソーム解析による新規関与リウマチ感受性遺伝子の探索

エクソーム解析による自己炎症疾患の遺伝的病因の解明

— 免疫プロテオームの機能低下が自己炎症疾患を惹起する

## 各論：体細胞変異

全エクソーム解析による骨髄異形成症候群の原因遺伝子の探索

全ゲノムシーケンシングによる癌の遺伝子変異プロファイル

がんゲノム研究におけるエクソーム解析の現状と将来

“ゲノム変異解析” 雑感

医歯薬出版株式会社

<http://www.ishiyaku.co.jp/>



# エクソーム解析——成果と将来

企画 松本直通 (横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学)

第1土曜特集

Vol.245 No.5 2013/5/4

341	はじめに.....	松本直通
	<b>総論</b>	
345	全エクソーム解析における情報処理.....	三嶋博之
352	日本人の遺伝子リファレンスライブラリーデータベース.....	日笠幸一郎・松田文彦
358	次世代シーケンサーによる病因遺伝子の探索と遺伝子診断への応用 .....	松原洋一・他
363	遺伝性疾患におけるエクソーム解析の有用性と近将来.....	吉浦孝一郎
369	遺伝性疾患におけるターゲットリシーケンシングの有用性.....	小崎健次郎
	<b>各論：生殖細胞系列変異</b>	
375	成育医療領域における大規模遺伝子解析.....	右田王介・秦 健一郎
381	常染色体優性遺伝性疾患のエクソーム解析.....	要 匡・柳 久美子
387	発達期の脳神経疾患の全エクソーム解析.....	才津浩智・松本直通
393	難聴の遺伝子診断と次世代シーケンス解析 ——保険収載された遺伝子診断からターゲットリシーケンシングとエクソーム解析 .....	西尾信哉・宇佐美真一
401	全エクソーム解析による遺伝性網脈絡膜疾患の原因遺伝子探索 .....	岩田 岳・他
408	ミトコンドリア呼吸鎖異常症のエキソーム解析.....	岡崎康司・大竹 明
415	全エクソーム解析による難治性循環器疾患の原因遺伝子の同定 .....	朝野仁裕・小室一成
422	小児血液疾患に対するエクソーム解析.....	村松秀城・小島勢二

# C O N T E N T S

<http://www.ishiyaku.co.jp/>

427	次世代シーケンシングによる先天性内分泌疾患の分子基盤の解明 .....鳴海覚志・長谷川奉延
433	エクソーム解析による遺伝性筋疾患の効率的遺伝子変異 スクリーニング法の開発と新規原因遺伝子同定.....遠藤ゆかり・西野一三
439	エクソーム解析による新規関節リウマチ感受性遺伝子の探索.....細道一善・他
445	エクソーム解析による自己炎症疾患の遺伝的素因の解明 ——免疫プロテアソームの機能低下が自己炎症疾患を惹起する.....北村明子・安友康二
<b>審論：体細胞変異</b>	
453	全エクソーム解析による骨髄異形成症候群の原因遺伝子の探索.....真田 昌
459	全ゲノムシーケンスによる癌の遺伝子変異プロファイル.....中川英刀
465	がんゲノム研究におけるエクソーム解析の現状と将来.....柴田龍弘・十時 泰
471	“ゲノム変異解析” 雑感.....油谷浩幸

## 目次

401	網膜、脈絡膜、黄斑
410	BN - PAGE (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
417	真の孤発性特発性拡張型心筋症とは
418	心筋症の表現型オーバーラップ
428	臨床遺伝子診断への次世代シーケンサーの参入
430	次世代シーケンシングは遺伝子診断に何をもたらすか
433	筋疾患
457	RNA スプライシング
457	RNA スプライシング分子変異を標的とした MDS 治療の可能性
461	カバレッジまたは深度
461	腫瘍内の不均一性
462	第三世代、第四世代のシーケンサー
470	次号の特集予告

# 全エクソーム解析による遺伝性網脈絡膜疾患の原因遺伝子探索

Investigation genes responsible for inherited retinal diseases by whole exome sequencing



岩田 岳(写真左) 古野正朗(写真中央) 池尾一穂(写真右)  
Takeshi IWATA<sup>1</sup>, Masaaki FURUNO<sup>2</sup> and Kazuho IKEO<sup>3</sup>

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<sup>1</sup>, 理化学研究所オミックス基盤研究領域<sup>2</sup>, 国立遺伝学研究所生命情報DDBJ研究センター<sup>3</sup>

◎ヒトが得る全情報の8割は視覚情報に由来すると考えられており、感覚器官のなかでも眼は重要な働きを担っている。眼の後極部に存在する網膜は、光を電気信号に変換する視細胞とそれに連結する視神経細胞やグリア細胞から構成されており、層状をなしている。とくに視細胞が集中する網膜のほぼ中心に位置する黄斑は、最大限に受光するために凹型となっており、血管や視神経細胞が光路を妨げないような構造となっている。遺伝性網脈絡膜疾患の多くは、視細胞や視神経細胞の機能に関与する遺伝子に変異が生じて発症するケースが多い。病態と遺伝形式別に分類すると、約30種類の遺伝性網脈絡膜疾患に分類され、すでに192遺伝子が報告されている。遺伝性網脈絡膜疾患の日本人患者やその家系を対象とした網羅的な遺伝子解析の研究はきわめて限られており、疾患と遺伝子の関係について十分な情報がない。著者らはこのような状況を少しでも改善するために、遺伝性網脈絡膜疾患の家系を対象とした全エクソーム解析によって網羅的な遺伝子解析を行い、日本人患者に関与する遺伝子の解明を試みた。

**Key word** : 遺伝性網脈絡膜疾患, 網膜, 視細胞, 黄斑, 遺伝子解析, 次世代シーケンサー

眼は透明な組織であることから、古くから眼内の病態が観察され、詳細に分類されてきた。さらに、技術的な進歩によって可視光、蛍光、赤外線を使った眼底像や、高解像度の網膜断層像(OCT)、視機能を記録するための網膜電図(ERG)が発達し、さらに遺伝子情報が加わることによる、より正確な診断が期待されている。眼科の臨床遺伝子研究は20年以上前に、脳回転状網脈絡膜萎縮症(gyrate atrophy)患者におけるオルニチンアミノ転移酵素遺伝子(ornithine aminotransferase)の変異が発見されてからはじまり<sup>1)</sup>、その後、網膜色素変性患者におけるロドプシン(rhodopsin)遺伝子変異の発見へと続き<sup>2)</sup>、黄斑ジストロフィー、加齢黄斑変性、緑内障、そして近視を含む多くの眼疾患に研究は広がっている。

塩基配列の変化と遺伝子機能への影響は個々の疾患によって異なり、高い相関を示す遺伝子変異

のなかには、遺伝子機能が失活するものから全く

## ガイド

### 網膜, 脈絡膜, 黄斑

**網膜** 眼の後極に存在する視細胞とこれに接続する視神経細胞が面状に並んだ部分。光情報を電気信号に変換し、脳へと信号を伝達する

**脈絡膜** 強膜の内側にある血管の豊富な膜で、網膜に酸素や養分を補給し、老廃物を運び出す役割がある。加齢黄斑変性では脈絡膜からの血管から網膜への滲出によって視細胞死に至る。網膜の脈絡膜からの剥離(網膜剥離)によっても、この部分の網膜機能は極端に低下する

**黄斑** 網膜の中心部にある直径2 mmほどの黄色領域。錐体細胞が集中し、視覚の解像度と色覚を決定するもっとも重要な部位である

影響しないものもある。近年における DNA シークエンス技術の革新的な発展によって、患者とその親族の網羅的な全エクソンや全ゲノムを解読することが可能となり、意図的に選別された遺伝子(候補遺伝子)を解析するスタイルから、網羅的な解析結果から考察するスタイルへと変化している。残念ながら現時点では根本的な治療が困難な疾患が多いが、疾患の原因遺伝子が明らかにされることによって診断の精度向上と治療法開発の基礎的情報が得られると考えられる。

本稿では遺伝性網脈絡膜疾患のエクソーム解析について、著者らの取組みを紹介する。

### 網膜の構造

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。網膜には光を電気信号に変換するための視細胞とこれに接続する視神経細胞、網膜色素上皮細胞、グリア細胞、そして血管が存在し、複雑な層構造を成している(図1)。厚さがわずか0.1~0.3 mmの網膜は感覚器網膜9層と網膜色素上皮細胞から構成され、感覚網膜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)には神経節細胞や内顆粒層が層間に位置して浅く陥凹し、無血管で、錐体細胞のみが網膜の表層に位置する構造になっている。

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、霊長類で再出現されたことが知られている。錐体細胞は桿体細胞に比べて細胞当りのエネルギー代謝が約8倍あり、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。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状況にあり、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。桿体細胞の機能が失われると暗いところで物が見えにくくなったり(鳥目、夜盲)、視野が狭くなったりするような症状を起し、錐体細胞が障害されると中心部が見えづら

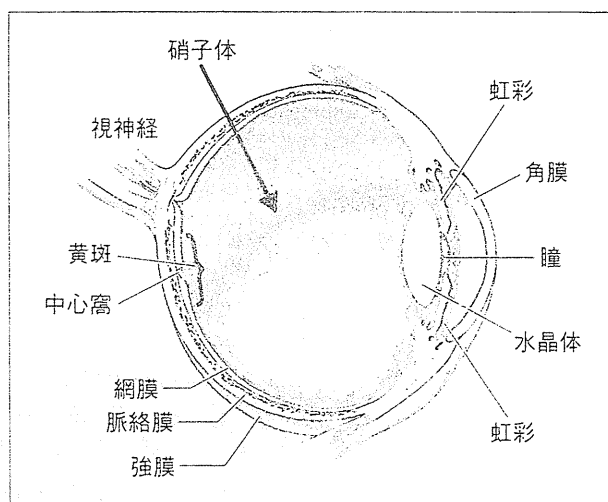


図1 眼球の構造

角膜と水晶体を通過した光は網膜のほぼ中央に位置する黄斑で結像する。中心窩は黄斑の中央に位置し、錐体細胞の密度が網膜中ではもっとも高い。

くなったり、色の識別ができなくなったりする(色覚異常)。

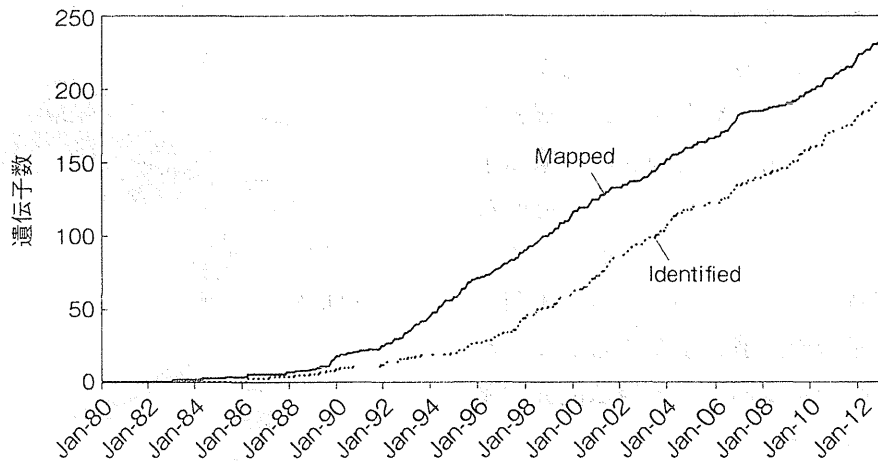
### 遺伝性網脈絡膜疾患

遺伝性網脈絡膜疾患はおもに視細胞および網膜色素上皮細胞を病巣としており、①網膜変性、②脈絡膜変性、そして③黄斑変性に大別される。

遺伝性網膜変性には網膜色素変性、錐体ジストロフィー、先天停在性夜盲、白点状網膜症、小口病などがある。とくに網膜色素変性は厚労省によって難病に指定されており、日本には30,000人以上の患者が存在する。もっとも遺伝子解析が進んでいる眼疾患である。遺伝性網脈絡膜変性にはレーバー先天盲、白点状網膜症、脈絡膜ジストロフィー、ミトコンドリア網膜症などがある。さらに、遺伝性黄斑変性には錐体ジストロフィー、錐体-桿体ジストロフィー、Stargardt病、卵黄状黄斑ジストロフィー、先天網膜分離症、オカルト黄斑ジストロフィーなどがある。遺伝性網脈絡膜疾患の原因遺伝子や感受性遺伝子の情報は、Retinal Information Network(RetNet; <https://sph.uth.edu/retnet/>)で閲覧することができる。疾患の遺伝子座の報告と原因遺伝子や感受性遺伝子の発見は年々増加しており、今後東洋人の解析が進むについて、さらに増加すると予想される(図2)。

黄斑疾患には浮腫、剝離、嚢腫、萎縮などの障害もあり、遺伝以外の要因によって発症する眼疾





Mapped and identified retinal disease genes(1980~2013)

図 2 遺伝性網脈絡膜遺伝子の探索

RetNet(Dager, S. P et al: Retinal Information Network. <https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>)によって集計された遺伝性網脈絡膜疾患の遺伝子座がマッピングされた遺伝子数と、変異が発見された遺伝子数、この15年間、一定の傾きで増加しており、今後アジア人口の解析が進むことからさらに増加すると考えられる。

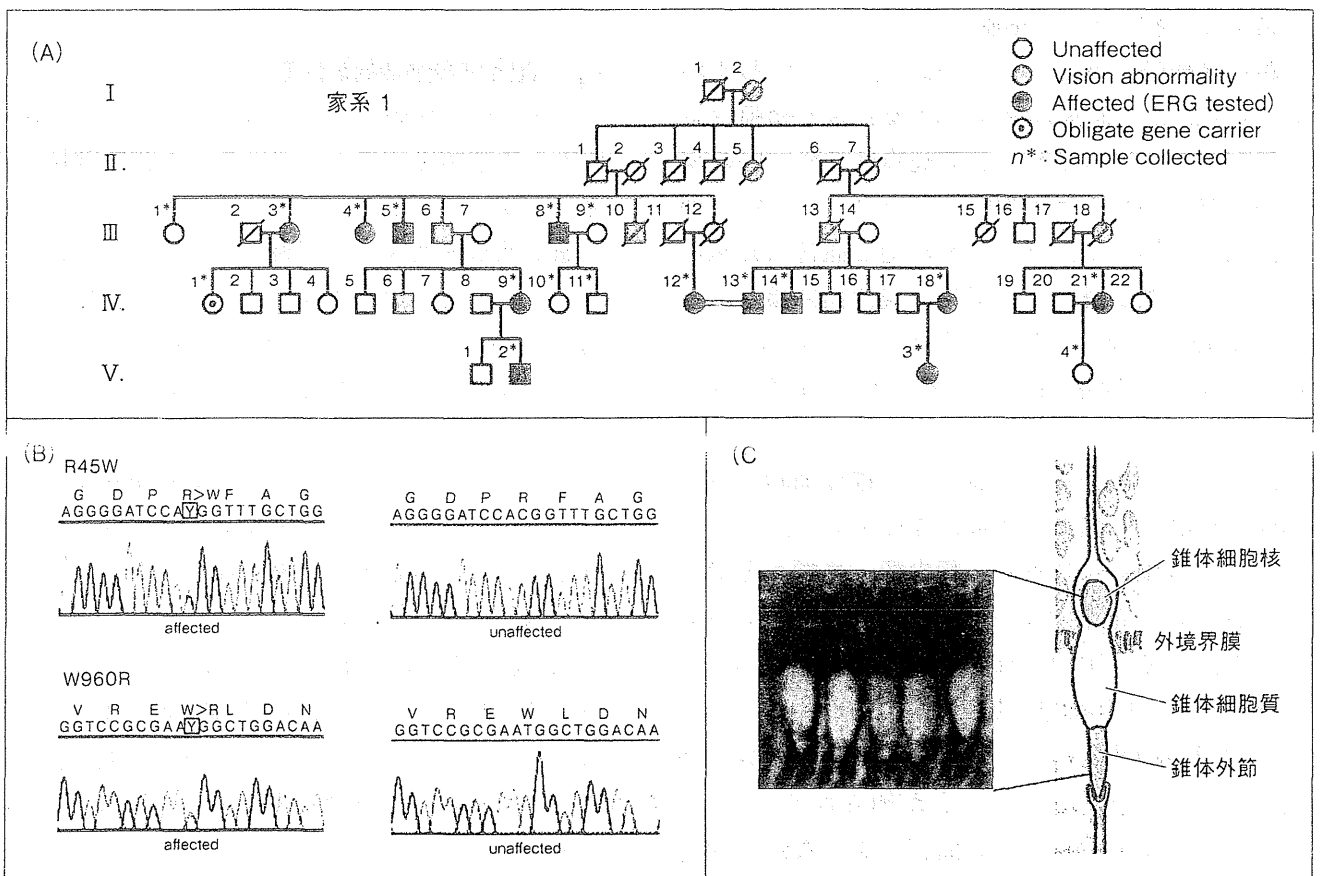


図 3 オカルト黄斑ジストロフィーとRP1L1遺伝子

A: オカルト黄斑ジストロフィーの家系. SNPhITLink 連鎖解析法によって、8番染色体短腕に疾患遺伝子がマッピングされた。

B: 患者に観察された RP1L1R45W と W960R 遺伝子変異。

C: RP1L1 の免疫染色(緑)。RP1L1 の N 末端に対して作製された抗体によって視細胞の外境界膜から外節に染色が認められた。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。

患もあるが、そのなかでも世界的に有病率の高い難病に加齢黄斑変性がある。アメリカでは中途失明の原因として第一位であり、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。多因子疾患として全ゲノム相関解析が行われ、医学分野では初めての感受性遺伝子、補体H因子(complement factor H)が発見されている<sup>3)</sup>。

### ✦ オカルト黄斑ジストロフィー(三宅病)

黄斑ジストロフィーの一種で、黄斑部の錐体機能のみが著しく低下する Mendel 優先遺伝形式のオカルト黄斑ジストロフィー(occult macular dystrophy: OMD)は日本人眼科医によって発見された数少ない眼疾患のひとつで<sup>4)</sup>、著者らによってその原因遺伝子が解明された。著者らは佐渡で発見された OMD の大家系から DNA 検体を収集し、SNP チップを用いた新しい連鎖解析法(SNP HiTLink)<sup>5)</sup>を用いて解析を行った(図3)。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、この連鎖不平衡の約10MBの領域に絞り込まれた。この領域には少なくとも128遺伝子が存在し、網膜で発現する22の遺伝子が抽出された。

さらに、各遺伝子の文献やデータベースによる情報から4つの遺伝子候補が選択され、ダイレクトシーケンスによって、*RP1L1*(R45W)遺伝子変異が発見された<sup>6)</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、当初は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ず、今回黄斑ジストロフィーの原因遺伝子変異として検出された。

ヒトRP1L1蛋白質に対して作製された抗体を用いてカニクイザルの網膜切片について免疫染色を行った結果、視細胞の外節と細胞体をつなぐ微小管(connecting cilia)に特異的な染色が観察された。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>7)</sup>。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、細胞輸送がもっとも盛んな中心窩において錐体細胞が十分に機能していない可能性もある。RP1L1はRP1蛋白質と相互作用することが明らかにされており、RP1が微小管の機能に関与していることからRP1L1も同様な機能があると考えられる。RP1の遺伝子変異によるOMDの発症について現在調査されている。

### ✦ 遺伝性網膜疾患のエクソームシーケンス

次世代シーケンサーによる全エクソン塩基配列解析技術により、家族単位で罹患者および親族のDNA検体を比較することによって、疾患の原因となる遺伝子変異を効率よく発見することが可能となった。著者らは、東京医療センターおよび関連病院で遺伝性網脈絡膜疾患の臨床診断と検体の収集を行っている。網膜疾患の臨床診断にあたっては電気生理学的検査を含む視機能検査を包括的に実施し、家系情報、症例情報(眼底所見、蛍光眼底造影、網膜電図)がオンライン症例登録システムを用いて東京医療センターで収集されている。

患者および親族から採取した血液より抽出したゲノムDNAのエクソームシーケンス解析は、理化学研究所オミックス基盤研究領域(理研OSC)にて行われている。理研OSCでは次世代シーケンサーを早期から導入し、独自のライブラリー作製技術および大規模塩基配列解析技術を用いたライフサイエンス研究を展開してきた<sup>8)</sup>。これらの施設と技術基盤を活用し、図4に示したプロセスに従ってエクソーム塩基配列解析を行っている。DNA品質検査プロセスでは収集されたDNA検体について吸光度測定、PicoGreenによる二本鎖DNA濃度定量を実施し、つぎに超音波破碎装置コバリスによる断片化およびアジレント社 Sure-Select キットを用いたライブラリー作製、エクソン濃縮を行う。このプロセスには最大96サンプルの同時処理が可能なアジレント社の自動ライブラリー作製システムを導入しており、ハイスルー

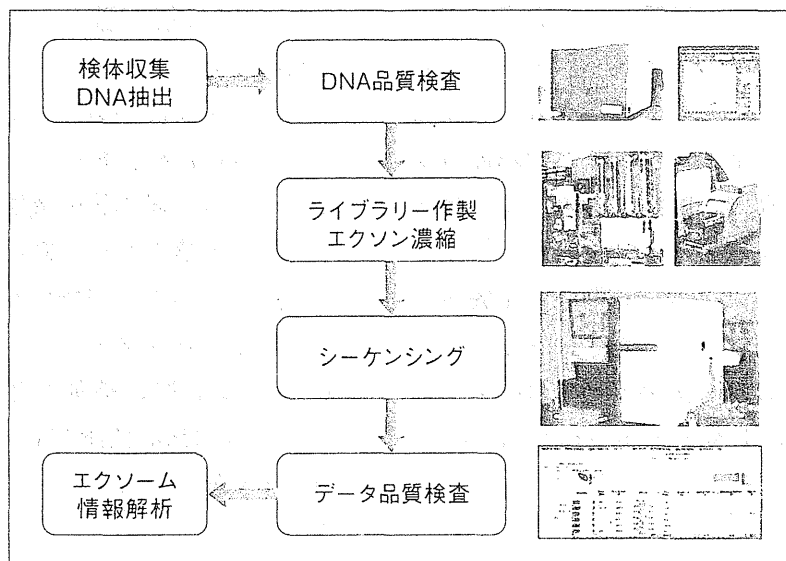


図 4 エクソーム解析の流れ

遺伝性網膜疾患家系より収集された検体について、DNA 品質検査、ライブラリー作製・エクソン濃縮、シーケンシング、およびデータ品質検査のプロセスを実行している。これらのプロセスにより得られたデータを用いて、疾患の原因変異を同定するための情報解析が行われる。

プット化とライブラリー品質の安定化を実現している。塩基配列解析にはイルミナ社 HiSeq2000 シーケンサーを用いている。

ライブラリー作製時にインデックス配列を付加することにより多検体のライブラリーを混合し、同時にシーケンシング解析することが可能である。たとえば、一度のランで50検体の同時解析を行うことで、1検体当たり約10GBの塩基配列データ(ターゲットエクソン領域の約140倍に相当)を得ることが可能である。得られた塩基配列データについては、検体当りの有効リード数やゲノムへのマッピング率など、エクソーム情報の解析に必要な品質を満たしていることを確認している。これらのプロセスは理研 OSC にて構築したプロジェクトの情報と進捗を記録するための LIMS (LS-archive) を用いて管理している。LS-archive にはプロジェクトの基本情報、サンプル情報、ライブラリー解析、シーケンス解析、データ解析の情報および各プロセスの実行状況が記録される。これらの情報は表やグラフにより視覚的に表示され、研究者がプロジェクトの進捗状況や品質を容易に把握することができる。

## エクソーム解析

全エクソーム解析(WXS)は、全ゲノム配列のなかの蛋白質をコードするエクソンのみに焦点を当てている。当然、全ゲノム領域を対象とした全ゲノムシーケンスのほうがより多くの情報量が期待されるが、エクソン領域は全ゲノム領域の1~1.5%であり、シーケンスおよびデータ解析に関するコストや時間が大幅に削減されるうえに、蛋白質配列に影響を与える重要な変異の情報を網羅的に得ることができる。エクソームを用いることにより蛋白質配列変異と疾患などの表現型の関連が明らかになることが期待される。この方法はまれな Mendel 遺伝疾患の原因遺伝子の探索で成果を収めており、さらに、より複雑な遺伝疾患の研究にも対象が広がられている。

具体的にエクソーム解析を行う場合についてデータ解析のプロセスを説明する(図5)。最初に得られた配列データからクオリティの低いものを除去する。これは後の解析において擬陽性を排除するために大事なプロセスである。つぎに、エクソームデータの場合にはすでに参照できるゲノム配列データがあることが前提であるので、まず得られたエクソーム配列を対照としてのリファレンスゲノムに貼り付けていく(マッピング)ことから



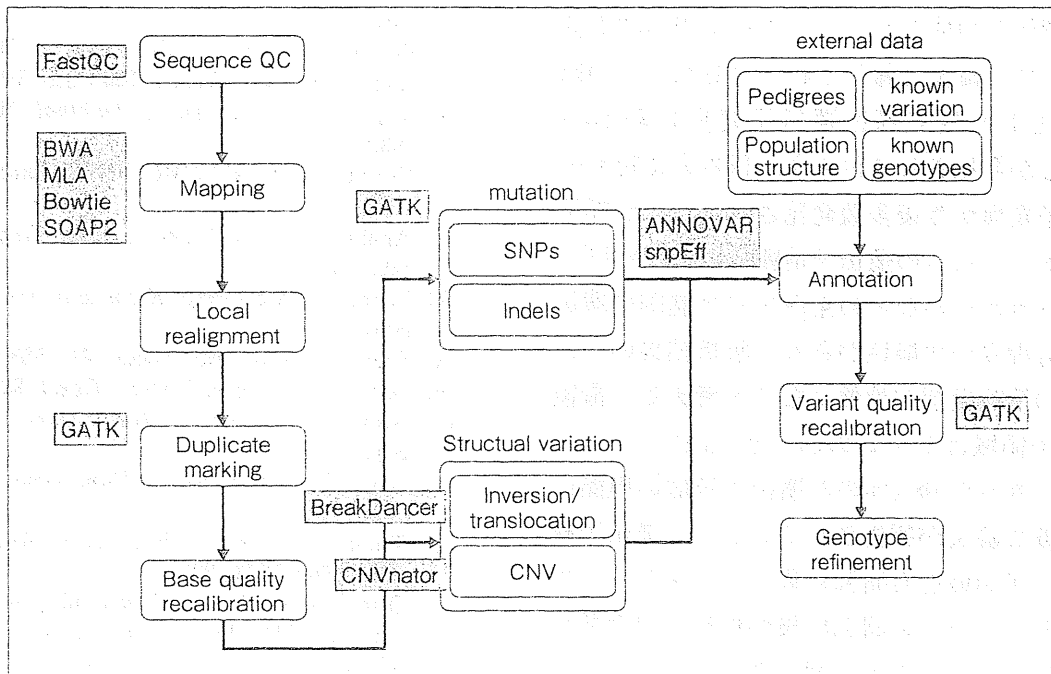


図 5 エクソームデータ解析のフロー

Re-sequencing による原因変異同定のための解析フロー。配列データのクオリティチェックからマッピング、コーリング、アノテーションまでの流れを示している。グレーに色づけられているのはそれぞれの処理に用いられるプログラムの名前である。

詳細な情報は <http://cell-innovation.nig.ac.jp/> から提供している。また、実際の解析パイプラインの実行も可能である。

はじまる。マッピングを行うために、著者らは BWA (Burrows-Wheeler Aligner) をおもに用いている。つぎに、参照ゲノムにマッピングされたエクソーム配列からサンプルのエクソン配列を再構築し、GATK (Genome Analysis Toolkit) を用いて挿入・欠失を含めた SNV の同定 (コーリング) を行う。得られた変異情報は snpEff や Annoter を用いてアノテーション情報が付加される。また、対象疾患に関連しない既知変異の除去や変異のパターンによってアミノ酸を変える非同義置換や変えない同義置換などの情報や種間での保存を考慮した情報量をもとに、機能に対する影響度を考慮して原因変異の同定を行う。

この際一番大事なのは、得られた SNP 情報からいかに効率よくかつ精度高く原因変異を抽出するかである。このために既知変異情報を用いたフィルタリングが有効である。この目的でよく使われるのが dbSNP のデータである。これはアメリカが中心となり世界中のさまざまな人種 1,000 人のゲノム配列の決定を行ったプロジェクトのデータを含んだ SNP 情報データベースである。このデー

タベース情報を用いることにより、既知変異や疾患に関連のない変異情報を取り除くことができる。

しかし、実際のデータを解析する場合には、これだけでかならずしもうまくいかないのも事実である。実際には家族サンプルや近親婚サンプルなどを使用してより精度の高い推定を行うことが行われている。さらに、対象としている疾患が浸透率 100% でない、表現型の定義が不十分であるなどにより、原因変異の同定が困難になることもある。また、エクソーム解析の弱点であるが、原因変異がエクソン以外の場所にあることもある。

### おわりに

近年の革新的な DNA シークエンス技術の進歩によって、全ゲノム配列を解読することを視野に入れた眼疾患の原因遺伝子探索が盛んになっている。アメリカを中心に、この技術を利用した遺伝性網脈絡膜疾患の新規原因遺伝子が複数報告されている<sup>9-13)</sup>。われわれは日本人患者とその親族のエクソーム解析によって、これまで十分な解析が行われていなかった遺伝性網脈絡膜疾患の網羅的

な遺伝子解析が可能となった。これまでの解析結果から、すでに論文で報告されている欧米人の家系を対象とした既知原因遺伝子変異は約10～15%程度しか発見されておらず、日本人に特有の新規遺伝子変異が今後多数発見されることが期待されている。これらの遺伝子情報は韓国、中国、台湾、シンガポールなどの東南アジア諸国の遺伝子解析にも役立つ可能性があり、解析結果のアジア地域への情報発信が重要になると考える。最後に、遺伝子領域はゲノムのわずか1.6%しか占めておらず、残りの98.4%の非遺伝子領域の機能について重要な論文が報告されている<sup>14)</sup>。遺伝子解析は非遺伝子領域をも研究対象とするステージに入っており、これらの研究成果が疾患の早期発見や予防に応用されることが期待される。

#### 文献

1) Mitchell, G A et al.: *J Clin. Invest.*, **81**: 630-633,

1988.  
 2) Rosenfeld, P J. et al.: *Nat. Genet.*, **1**: 209-213, 1992.  
 3) Klein, R J et al.: *Science*, **308**: 385-389, 2005.  
 4) Miyake, Y et al.: *Am J Ophthal*, **108**: 292-299, 1989  
 5) Fukuda, Y et al.: *BMC Bioinformatics*, **10**: 121, 2009.  
 6) Akahori, M et al.: *Am. J. Hum. Genet.*, **87**: 424-429, 2010  
 7) Eckmiller, M. S.: *Prog. Retin. Eye Res.*, **23**: 495-522, 2004  
 8) Suzuki, H et al.: *Nat. Genet.*, **41**: 553-562, 2009  
 9) Zetz, C. et al.: *Am. J. Hum. Genet.*, **92**: 67-75, 2013.  
 10) Audo, I. et al.: *Am. J. Hum. Genet.*, **90**: 321-330, 2012.  
 11) Ozgöl, R. K. et al.: *Am J. Hum. Genet.*, **89**: 253-264, 2011.  
 12) Tucker, B A et al.: *Proc. Natl. Acad Sci USA*, **108**: E569-E576, 2011.  
 13) Otto, E. A et al.: *Nat. Genet.*, **42**: 840-850, 2010.  
 14) The ENCODE Project Consortium: *Nature*, **486**: 57-74, 2012.

\* \* \*

# Medical Science Digest

# M S D

Vol.39

No.3

2013

通巻506号

# 3

## メディカルサイエンスダイジェスト

特集

# アンチエイジングと疾患

特集編輯 森下 竜一

(大阪大学臨床遺伝子治療学)

アンチエイジング医学の実践

森下 竜一

(大阪大学臨床遺伝子治療学)

細胞老化におけるp53の役割

田中 知明・橋本 直子

(千葉大学細胞治療学)

血管内皮機能と個体寿命

長谷川 豊・片桐 秀樹

(東北大学代謝疾患学分野)

骨代謝と血管石灰化の

共通分子機構

中神 啓徳・森下 竜一

(大阪大学小児発達学研究所・臨床遺伝子治療学)

代謝性疾患と細胞老化

林 由香・南野 徹

(新潟大学循環器内科)

Diagnosis

Optineurinと正常眼圧緑内障

岩田 岳

((独立)国立病院機構東京医療センター)

New Technology

全反射型蛍光顕微鏡

永松 信哉・青柳 共太

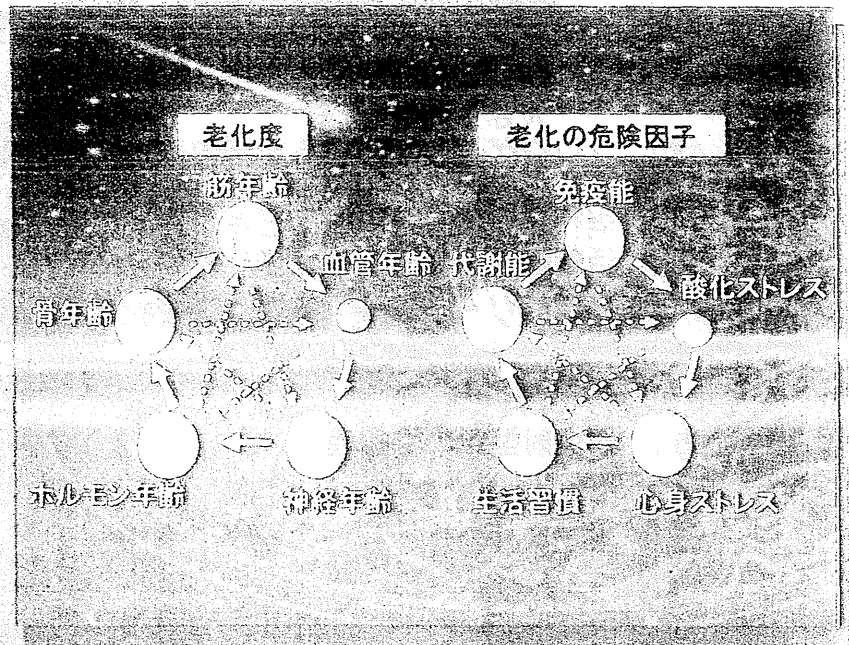
(杏林大学生化学)

Cutting Edge

高IgE症候群についての最近の知見

峯岸 克行

(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)



# MSD Medical Science Digest

## メディカル・サイエンス・ダイジェスト

Vol.39 No3 2013

3月号

### 目次

## 特集 アンチエイジングと疾患

What is Anti-Aging Medicine ?

特集編輯 森下 竜一

- |  |                                |                 |
|--|--------------------------------|-----------------|
| 9  | アンチエイジング医学の実践                  | 森下 竜一           |
| 10   | 細胞老化におけるp53の役割                 | 田中 知明・橋本 直子     |
| 15   | 血管内皮機能と個体寿命                    | 長谷川 豊・片桐 秀樹     |
| 19   | 骨代謝と血管石灰化の共通分子機構               | 中神 啓徳・森下 竜一     |
| 23   | 代謝性疾患と細胞老化                     | 林 由香・南野 徹       |
| ◆ Industry News ◆                          |                                |                 |
| 27   | 光による皮膚のアンチエイジング治療の現状           | 根岸 圭            |
| 31   | 高吸収クルクミン製剤のアンチエイジングと疾患に関する開発動向 | 今泉 厚            |
| 35   | レーザー治療による“見た目のアンチエイジング”        | 西村 浩之           |
| 40   | 肌のバリア機能を左右するヒアルロン酸分子の大きさと代謝    | 成田 美穂・田中 美登里    |
| 43   | クロロゲン酸類による血管内皮と体脂肪に対する効果       | 森 建太・長谷 正・桂木 能久 |
| 48   | 老化に対する運動とユビキノールの併用効果           | 藤井 健志           |
| 50   | 活性型ビタミンDの体内における役割とその重要性        | 石井 成幸           |
| ◆ Digestシリーズ ◆—新規原因遺伝子Optineurin—Vol.5 (完) |                                |                 |
| 2  | Optineurinと正常眼圧緑内障             | 岩田 岳            |
| ◆ New Technology ◆                         |                                |                 |
| 5  | 全反射型蛍光顕微鏡                      | 永松 信哉・青柳 共太     |
| ◆ Cutting Edge ◆                           |                                |                 |
| 7  | 高IgE症候群についての最近の知見              | 峯岸 克行           |

#### 表紙写真の解説

アンチエイジング治療の原則は、病気になる前に、老化度や老化の危険因子を判定し、弱点の是正や改善に努めることである。図は、老化度や老化危険因子の各指標を知り、このバランスが崩れると病気が発症する。  
(表紙図提供・解説：大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学 森下竜一)

#### Medical Science Digest 編集委員会

- |                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| 編集委員長 本庶 佑 (京都大学医学部教授)  | 服部信孝 (順天堂大学医学部教授) |
| 編集委員 伊藤 裕 (慶應義塾大学医学部教授) | 山本一彦 (東京大学医学部教授)  |
| 岡野栄之 (慶應義塾大学医学部教授)      | 渡辺 守 (東京医科歯科大学教授) |
| 門脇 孝 (東京大学医学部教授)        |                   |
| 武谷雄二 (東京大学名誉教授)         |                   |
| 中内啓光 (東京大学医科学研究所教授)     |                   |

(五十音順)

## Optineurinと正常眼圧緑内障

Optineurin and glaucoma

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）  
分子細胞生物学研究部



岩田 岳 (いわた たけし)

1988年名城大学大学院農学研究科博士課程卒業。'88年National Eye Institute, NIH留学。2004年(独)国立病院機構東京医療センター臨床研究センター室長, '07年同 部長。研究テーマ: 遺伝性網膜疾患, 緑内障, 加齢黄斑変性

Key Words: Optineurin, Rab8, Normal tension glaucoma

### はじめに

緑内障は視神経の中でも神経節細胞死を主な特徴とする眼疾患で, 周辺視野から視野欠損が進行する。日本人における失明原因で最も有病率が高い眼疾患であり, その原因解明と進行予防の薬物開発が進んでいるが根本治療には至っていない。緑内障は病理学的に開放隅角緑内障, 閉塞隅角緑内障そして発達緑内障に分類され, その中でも開放隅角緑内障が最も患者数が多い。緑内障は眼圧の上昇をともなう場合とともなわない場合があり, 日本人には後者が多いことが, 岐阜県多治見市で行われた疫学的調査<sup>1)</sup>によって明らかにされている。眼圧上昇は眼球前房を循環する房水の流出路にあたる線維柱帯やその背後にあるシュレム管の障害によって流出抵抗が増加することによって眼内圧が高まると予想され, この圧力上昇は眼球後極の視神経に機械的なストレスを与える。

緑内障は多因子疾患と考えられており, 加齢にともなう機能低下によって発症頻度は上昇するが, その病態機序は未だ不明である。遺伝要因の重要性が強調されてきたが, ゲノム相関解析などでも特定の遺伝子変異を発見するには至っていない。

このような状況において, 低い頻度ではあるが, 高いオッズ比で緑内障を誘発する少数の遺伝子変異が明らかにされている。この中でも高眼圧の開放隅角緑内障の原因遺伝子としてミオシリン(Myocilin)と正常眼圧緑内障の原因遺伝子としてオプチニューリン(Optineurin)が複数の研究グループによって確認されている。これらは緑内障の分子メカニズムを解明する数少ない手掛かりとして, 精力的に研究されている。

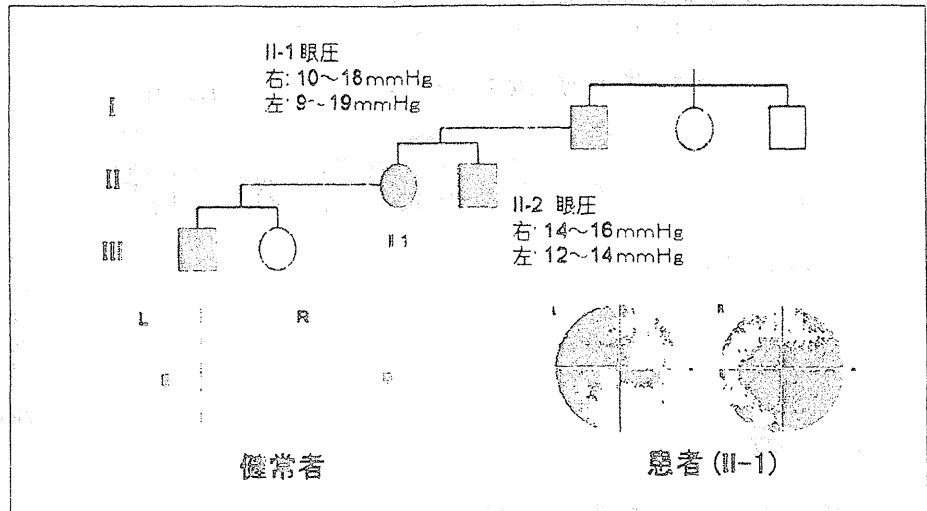
### 緑内障原因遺伝子オプチニューリンの発見

正常眼圧緑内障の家系について連鎖解析が行われ, その原因遺伝子の遺伝子座が染色体10p15-p14(GLC1E)に存在することが明らかになり<sup>2)</sup>後にこの領域にOptic Neuropathy Inducing Protein, オプチニューリン(Optineurin, OPTN)が発見された<sup>3)</sup>。この最初の論文で調査された開放隅角緑内障の約16%の家系においてオプチニューリンの遺伝子変異が発見されたと報告されたが, 世界的な検証によってその多くは遺伝子多型として検出され, 現在ではGlu50Lys(E50K)が唯一緑内障の原因遺伝子変異として認知されている。この遺伝子変異によ

■ Takeshi Iwata

National Hospital Organization Tokyo Medical Center  
National Institute of Sensory Organs, Division of Molecular & Cellular Biology

図1 オプチニューリン E50Kが検出された正常眼圧緑内障の家系図と視野検査  
 黒塗り患者，白塗り健康者（岐阜大学医学部眼科学教室 山本哲也教授，川瀬和秀准教授より情報提供<sup>4)</sup>）



て重篤な正常眼圧緑内障を発症する家系が岐阜大学眼科学教室の山本哲也教授，川瀬和秀准教授によって発見され（図1），この家系の10代，40代，70代のそれぞれの患者を診断することによって，視野欠損が進行することが明らかにされた<sup>4)</sup>。また船山，布施らによって日本人緑内障患者においてH26Dの遺伝子変異も報告されている<sup>6)</sup>。

■緑内障に関係するオプチニューリンの機能

オプチニューリンタンパク質は577アミノ酸から構成され，多くの細胞で発現している。オプチニューリンは複数のタンパク質と相互作用することが知られており，Rab8，ハンチントン，ミオシンVIなど，細胞内のゴルジ体から細胞膜外への分泌機能に関わっていると考えられる。細胞内でのオプチニューリンの欠損によって小胞体の分解が促されるとの報告がある(RD 2012, Bavaria, Germany)。E50Kが位置するタンパク質のN末端よりの部分はbZIP構造になっており，Rab8の結合部に近いことから，E50K変異によって，オプチニューリンとRab8との相互作用が障害されると考えた筆者らは，これを証明するために分子間相互作用やE50Kを高発現す

るトランスジェニックマウスを作製して，これを証明した<sup>4)</sup>（図2）。

さらに，高眼圧の緑内障遺伝子ミオシリンとオプチニューリンは相互作用するとの報告があり，これらの緑内障タンパク質は同じパスウェイに関係することが示唆されている。全ゲノム相関解析によってアポリポタンパク質(ApoE) 遺伝子のプロモーター領域 (-219G)に発見された遺伝子多型は視神経乳頭の障害と強く相関しており，さらにApoE 遺伝子はModifier Geneとしてミオシリンの転写活性に作用して，高眼圧の開放隅角緑内障を発症させるとの報告もある。Modifier Geneとは他の遺伝子に影響力を持つ遺伝子であり<sup>7)</sup>，同様な関係が

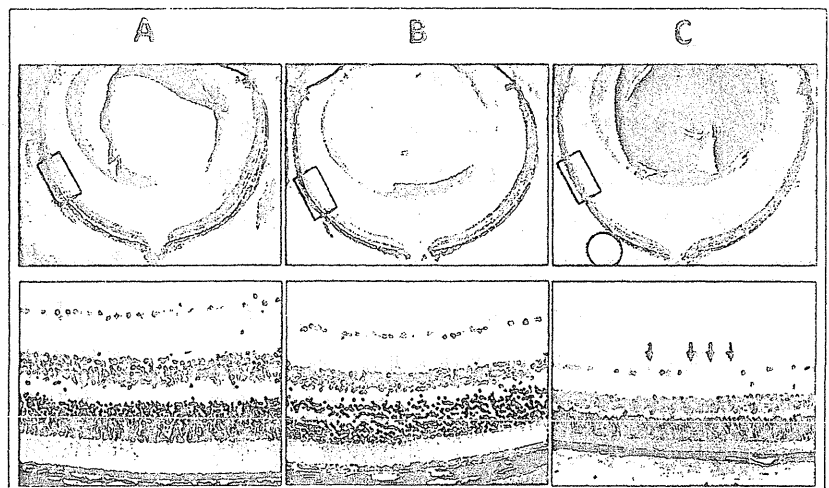


図2 オプチニューリンE50K変異体を発現するトランスジェニックマウスの眼球切片  
 網膜の周辺域で視神経の委縮が観察された。A：正常マウス，B：野生型オプチニューリントランスジェニックマウス，C：E50K変異体オプチニューリントランスジェニックマウス<sup>10)</sup> 周辺網膜の委縮が観察される。



TNF- $\alpha$  とオプチニューリンの遺伝子多型についても報告されている<sup>6)</sup>。

#### ■オプチニューリン変異体を発現する

##### 緑内障モデル動物の開発

緑内障研究においてモデル動物の存在はきわめて重要な存在である。モデル動物を使って隅角や視神経網膜における進行を経時的に観察することや薬効評価に利用できることが求められる。これまでも自然発症のイヌや隅角の外科的手術による霊長類モデル動物が報告されてきた。緑内障の原因遺伝子の解析には遺伝子改変に適するマウスが、広く使われているが、マウスとヒトでは眼球サイズが大きく異なり、神経乳頭周辺の血管構造が異なることや、篩状板が存在しないなどの違いがあり、その取り扱いや実験結果の解釈が難しい。マウスの系統によっては10から20 mmHgの眼圧差が存在することも知られている。緑内障遺伝子としてはオプチニューリンとミオシリン等の遺伝子改変マウスが作製され、緑内障の発症機序解明の研究に利用されている。

我々が作製したオプチニューリンE50K変異体を発現したマウスでは、正常眼圧が維持されたまま、生後1年で網膜神経節細胞死や視神経乳頭の陥凹が観察されている<sup>7)</sup>。視神経の障害は網膜周辺から徐々に中央へと進行することが観察されている。さらにグリア細胞の活性化による周辺神経細胞への影響や血流障害の可能性が示唆された。このマウスに対比されるのが、ミオシリンTyr437His変異を発現する眼圧上昇型のトランスジェニックマウスである。このマウスは正常マウスに比べて昼は2 mmHg、夜は4 mmHgの眼圧上昇が認められ、生後1年目には網膜神経節細胞数の20%が減少する<sup>7)</sup>。

#### ■おわりに

緑内障の病態機序に関する情報が限られる状況において、オプチニューリン遺伝子変異による正常眼圧緑内障の発症は世界中の眼科研究者を引き付けている。E50Kトランスジェニックマウスによっ

てオプチニューリンの変異体が網膜内のどの細胞にストレスとなっているか明らかになってきた。さらにオプチニューリンが関わる小胞顆粒の輸送について、どのような生体分子の分泌に関わっているのか明らかにされることによって、この生体分子が正常眼圧緑内障の薬としても開発される可能性もある。日本人には家族性の緑内障が多く存在することが知られており、次世代型DNAシーケンサーの登場により、これらの原因を明らかにする研究プロジェクトが日本で進行しており、その成果が期待されている。

#### 文 献

- 1) Iwase A, Suzuki Y, Arae M, *et al*. Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology* 2004, 111: 1641-8
- 2) Sarfarazi M, Child A, Stojilova D, *et al*. Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region. *Am J Hum Genet* 1998, 62: 641-52.
- 3) Rezaie T, Child A, Hitchings R, *et al*. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 2002, 295: 1077-9
- 4) Chi Z-L, Akahori, A, Obazawa M, *et al*. Overexpression of optineurin E50K disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive retinal degeneration in mice. *Hum Mol Genet* 2010;19 : 2605-15
- 5) Copin B, Brézin AP, Valtot F, *et al*. Apolipoprotein E promoter singlenucleotide polymorphisms affect the phenotype of primary open angle glaucoma and demonstrate interaction with the myocilin gene. *Am J Hum Genet* 2002, 70: 1575-81.
- 6) Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, *et al*. Variants in optineurin gene and their association with tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms in Japanese patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 4359-67
- 7) Senatorov VV, Malyukova I, Fariss R, *et al*. Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *J Neurosci*. 2006; 26: 11903-14.

#### News(学術情報)

第43回日本心臓血管外科学会学術総会のお知らせ

開催日：2月25日(月)～27日(水)

代表者：小山 信彌(東邦大学教授)

会場：ホテルグランバシフィック LEDAIBA

事務局連絡先：東邦大学医学部外科学講座心臓血管外科

TEL：03-5763-6664 FAX：03-3765-6659

常設事務局URL：http://jscvs.umin.ac.jp/

開催案内URL：http://www.jscvs.jp/43/

厚生労働省 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 24 年度 総括研究報告書

岩田 岳

平成 25 年 5 月

