

201224034B

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22～24年度 総合研究報告書

平成25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22～24年度 総合研究報告書

平成25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25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	小林正昭	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 : masaakikobayashi@ntmc.hosp.go.jp	事務員

# 目 次

## I. 総合研究報告

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. 総合研究報告

平成22～24年度 厚生省科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
総合研究報告書

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一部長

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

#### 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)、オブチニューリン(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

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・マーマセットを作製して薬効試験を行う。

#### 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7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。各エクソンのDNAシーケンスは平均リード数を100回まで行い、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が決定された。エクソン配列は1,000人ゲノムプロジェクトのdbSNPデータベースや健常者のエクソン配列に対して比較された。

##### 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、カンクイザル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) 実験動物中央研究所において、トランスジェニック・カンクイザルを作製したいと考えている (Sasaki et al, Nature 2009)。カンクイザルは旧世界サルに属し、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: 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。

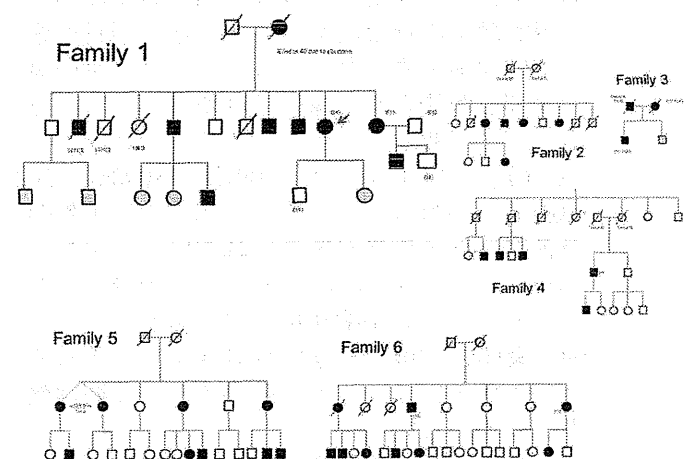
#### 6) 早期発見と発症機序の解明による予防・治療法の開発

(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7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100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人および1,000ゲノムプロジェクトの配

列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350人を解析した結果、約10%の患者にこの遺伝子の多型が強く相関することが明らかとなった。

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

家系1で発見された遺伝子変異(rare variant)は他家系では検出されず、他家系は家系1とは異なる遺伝子により発症していると考えられる。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、カニクイザル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 を強制発現するトランスジェニック・マウスを作製中であり、この遺伝子を発現しないノックアウト・マウスについてはすでに作製されており、これを譲渡していただくことによって緑内障との関係をさらに in vivo で詳しく研究する予定である。カニクイザルの作製については予備試験を霊長類センターと共同で開始した。

### 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

マウスモデル動物作成後、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。そこで common disease multiple rare variants 仮説にしたがって、家族性の緑内障に注目し、この原因遺伝子を解明してから、この遺伝子を入れるにおける一般的な緑内障患者との関係を解析した。その結果、家系1の遺伝子を解明し、この遺伝子に含まれるエクソン4~6付近にある遺伝子多型がきわめて強く一般的な開放隅角緑内障の患者と相関することが明らかとなった。一般的な開放隅角緑内障患者の約10%がこの多型を持っており、この多型の付近のイントロンかプロモーター領域に疾患を引き起こす遺伝子配列があると探索中である。今回の解析結果は、common disease multiple rare variants 仮説を実証するものであり、相関しなかった患者についても探索を続ける予定である。

## 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子変異が発見された。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できると期待される。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

平成24年度

論文発表

Minegishi Y, Iejima D, Kobayashi H, Chi Z-L, Kawase K, Yamamoto T, Seki T, Yuasa S, Fukuda K, Iwata T. Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein insolubility and initiates familial primary open-angle glaucoma. Human Molecular Genetics 2013; Advance online publication

Thakkinstian A, McEvoy M, McKay GJ, Chakravarthy U, Chakrabati S, Kaur I, Silvetri G, Francis P, Iwata T, Akahori M, Farwick A, Euijung R, Edward A, Seddon JM, Attia J. The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. American Journal of Epidemiology 2012;10.1093/aje/kws03

Kabuto T, Takahashi H, Goto-Fukuura Y, Igarashi T, Akahori M, Kameya S, Iwata T, Mizota A, Yamaki K, Miyake Y, Takahashi H. A new mutation in the RP11 gene in a patient with occult macular dystrophy associated with a depolarizing pattern of

focal macular electroretinograms. Molecular Vision 2012;18:1031-9

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 RP11 gene. Retina 2012; Mar 29 epub

書籍

岩田岳, Optineurin と正常眼圧緑内障, Digest シリーズ (企画:本庶佑), Medical Science Digest, ニューサイエンス社 2013;39:2-4 学会発表

岩田岳, 古野正朗, 池尾一穂, 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, エクソーム解析 -成果と将来- (企画:松本直道), 医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社 2013;245:401-407

岩田岳, 眼疾患をきたす遺伝子変化, 第117回日眼評議員会指名講演:「眼疾患と遺伝子」をより理解するために, 日本の眼科, 公益社団法人日本眼科医会 2013;84:265-269

学会発表

岩田岳, 次世代シーケンサーを用いた眼疾患の原因遺伝子の探索, 116回日本眼科学会, 2012年4月, 東京

岩田岳, 補体抑制による加齢黄斑変性発症抑制の試み, 第49回補体シンポジウム, 2012年8月, 大阪

Takeshi Iwata, Disease and Biology of the Macula, 第1回銀川国際眼科フォーラム, 2012年8月, 中国銀川市

峯岸ゆり子, 小林宏明, 家島大輔, 岩田岳, オプチニューリン E50K 変異体による正常眼圧緑内障の病態機序の解明, 2012年12月, 東京

Yuriko Minegishi, Hiroaki Kobayashi, Takeshi Iwata. Comparative functional analysis of optineurin and its glaucoma-related mutant E50K by mammalian cell-based LC-MS/MS proteomics. 2012

Biennial Meeting International Society for Eye Research. August 2012, Berlin, Germany

中山真央、亀井淳三、溝田淳、岩田岳、加齢黄斑変性感受性遺伝子HtrA1のトランスジェニックマウスモデルを用いた習慣危険因子(喫煙)の影響に関する研究、喫煙科学研究財団平成23年度助成研究発表会。2012年7月、東京

田邊和彦、木村至、岡本はる、村上晶、海老原伸行、岩田岳、毛様体におけるRab8およびERM familyの発現変化の検討、第23回日本緑内障学会、2012年9月、奈良

平成23年度

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, Hiramami 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)

## 平成22年度

### 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

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

#### 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

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・マーマセットを作製して薬効試験を行う。

#### 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: 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。

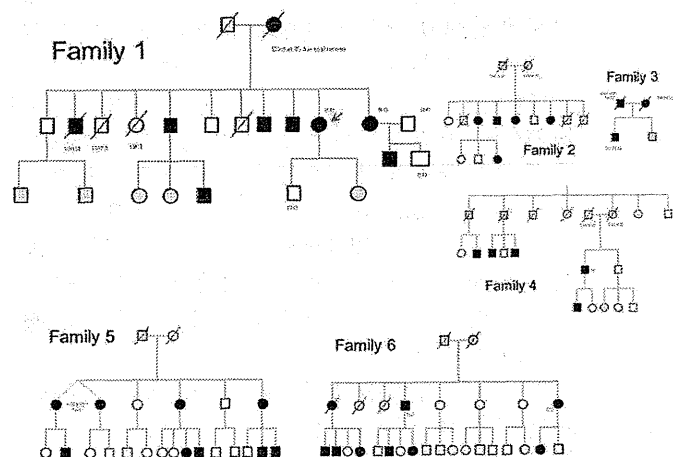
### 6) 早期発見と発症機序の解明による予防・治療法の開発

(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) によって塩基配列を解読し、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。遺伝子の種類によつ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)解析によつて、発症経路を予測する。その経路を阻害する薬を選別し、細胞実験によつ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つ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。遺伝子変異によつ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

本研究によつ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つ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つていても同じ遺伝子が関わつ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

平成22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、日本人における遺伝性の緑内障家系を複数収集し、原因遺伝子を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孤発例の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、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

#### 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

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・マーマセットを作製して薬効試験を行う。

#### 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、閉塞隅角)の家系(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2家系は検体が集まり、既知の緑内障遺伝子に変異がないことを確認するために、MYOC、OPTN、WDR36の遺伝子解析を行っている。

##### 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(Illumina, Agilent, Roche Nimblegen)、次世代シーケンサー(HiSeq2000, Illumina)によって塩基破綻を解読する。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、エクソンのカバー率が50回に達したところで、全エクソンの配列が決定する。各エクソン配列は患者と健常者の間で比較され、原因遺伝子変異を決定する。

##### 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: 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、閉塞隅角) の家系 (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2家系は検体が集まり、既知の緑内障遺伝子に変異がないことを確認するために、MYOC、OPTN、WDR36 の遺伝子解析を行っている。

##### 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 (Illumina)、次世代シーケンサー (HiSeq2000, Illumina) によって塩基破裂を解読し、レファレンスゲノム配列に対してマッピングした。エクソンのカバー率は平均で50回に達していたので、これでエクソン配列を決定し、患者と健常者の間で配列の比較が行われている。

##### 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、多数の患者で関連する遺伝子多型 common variants の探索が世界各地で数千人規模の全ゲノム関連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関連解析では、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関連解析では、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) が複数個組み合わせられて、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高い。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かと期待される。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 のように統計学的にとどまらず、機能解析によって具体的な予防・治療法の開発が期待される。

### F. 健康危険情報