

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
総括研究報告書

加齢黄斑変性に対する個別化医療実現のための前向き臨床研究にもとづく
ゲノムワイド関連解析

研究代表者 吉村 長久 京都大学医学研究科教授

研究要旨

加齢黄斑変性（AMD）は先進国における社会的中途失明の最大の原因となっており、複数ある治療方法から最適の治療方法を選択できずに試行錯誤を繰り返す数ヶ月の間に進行してしまうことが多い。各患者に最適な治療方法を選択し、早期にその治療を開始することができれば、重症化の防止、QOLの向上・自立支援につながるだけでなく、医療経済上の問題の改善にもつながる。

このような個別化医療の実現のために、遺伝子多型が活用できる。本研究では日本人独自の遺伝子多型を用いた個別化医療を実現するために多施設前向き研究を行う。平成23年度には国内の15の施設と共同で抗VEGF治療の前向き研究を開始するとともに、これまでに光線力学療法を行ってきた症例を集めて、光線力学療法の治療効果に相関する遺伝子多型を解明するためのゲノムワイド関連解析を開始した。平成24年度以降には上記前向き研究の結果をもとに抗VEGF治療の効果に相関を認める遺伝子多型をゲノムワイド関連解析によって解明し、AMDの個別化医療に活用できることが判明した遺伝子多型の迅速検出キットを作成して、精度の高い個別化医療を実践していく。

研究分担者

山城健児（京都大学・助教）
本田茂（神戸大学・講師）
米谷新（埼玉医科大学・教授）
岩田岳（東京医療センター・部長）

A．研究目的

加齢黄斑変性（AMD）は先進国における社会的中途失明の最大の原因となっており、我が国でも近年急速に増加している疾患である。最近になって光線力学療法や硝子体注射薬といった治療方法が開発され、加療可能な疾患となってきたが、これらの治療方法の効果は視力を回復させるには十分ではない。患者ごとに各治療方法の効果が異なることから、これら複数の治療方法から各患者に最適な治療方法を選択することができれば、各患者における重症化の防止、QOLの向上・自立支援につながり、さらに医療費の抑制にもつながると考えられる。

近年、AMDの発症や治療結果に遺伝子（CFH、ARMS2等）の多型が関与することが分かってきたため、この遺伝子多型を用いて個別化医療を実現しようという気運が高まってきた。本研究では遺伝子多型を用いた個別化医療の精度の向上によって適切なAMDの治療を目指し、同時に不必要な治療や通院の抑制を測りたい。

我々のこれまでの研究から、欧米人と日本人とでは関与する遺伝子多型の強弱に差があることが分かりつつある。つまり遺伝子多型を用いて個別化医療を実現するためには、

日本人におけるAMDに關与する遺伝子多型の研究が不可欠であると考えられる。

我々は既にARMS2遺伝子のA69S多型の迅速キットを作成し、実際の臨床治療に利用し始めている。また、これまでの我々の研究ではARMS2、CFH、VEGF、PEDFといった遺伝子の多型が様々な治療による予後に影響していることが分かってきた。しかし、他にも治療効果に影響する遺伝子多型は複数存在するはずで、本研究ではこれまでの研究成果を前向き研究を行うことによって確固としたものにしていくと同時に、ゲノムワイド関連解析を行うことによって新たな相関遺伝子多型を明らかにしていく。

平成23年度には国内約15施設でこれまでに光線力学療法を施行されてきた患者の治療経過を参考に、血液サンプルを用いてゲノムワイド関連解析を行うことによって、光線力学療法の治療結果に相関する遺伝子多型を解明し、また抗VEGF薬による治療結果に相関する遺伝子多型を検出するための前向き研究を開始した。平成24年度には前向き研究の治療結果を参考にゲノムワイド関連解析を行って、抗VEGF薬による治療結果に相関する遺伝子多型を明らかにした。平成25年度には治療方針を決定するために有用な遺伝子多型について再現性を確認し、その有用性を検証した。さらに遺伝子多型の迅速検出キットを作成し、個別化医療の精度の向上を目指した。

B．研究方法

AMD個別化医療研究会参加施設（京大、神戸大、埼玉医大、東京医療センター）および協力施設（福島医大、群馬大、山梨大、東大、名市大、阪大、関西医大、島根大、聖隷浜松病院、大塚眼科、宮田眼科）で臨床研究を進めてきた。

これまで主力の治療方法であった光線力学療法および、平成22年春頃から使用が開始されてきた抗VEGF薬による治療後の反応・予後と関連する遺伝子多型をゲノムワイド関連解析の手法を用いて解明した。光線力学療法についてはこれまでに多数例の治療データが各施設に蓄積されているため、まず始めに後ろ向き研究を行うことで、関連遺伝子多型を解明した。抗VEGF薬治療については各施設から患者登録を行い、前向き研究を行い、ゲノムワイド関連解析の結果、抗VEGF治療の反応性を予測出来る可能性のある候補遺伝子の発見に成功した。各治療方法を行った際の反応・予後を予測するために有用な遺伝子多型を検出する迅速キットを作成し、キットを用いて各患者に最適な治療方法を選択し、実際に個別化医療を行ったうえで、その成果の検証を試みた。

【前向き研究 - 抗VEGF治療】

すべての施設での倫理委員会の承認を得た後、各施設で20-30例程度のエントリーを行い、通常の抗VEGF治療を順次行った。治療開始前の必須検査は視力検査、眼底検査、造影検査、光干渉断層計検査とし、治療後は毎月視力検査、眼底検査、光干渉断層計検査を行い臨床経過を記録した。末梢血サンプルは、連結可能匿名化を行ったあとにDNA抽出を行い、ゲノムワイド関連解析の準備を行った。

平成24年度内には、1年以上の経過が追えた患者が256例を超えたため、その256例のDNAサンプルと臨床経過（治療の有効性、視力予後、再発の有無）を用いてゲノムワイド関連解析を行った。有力な候補遺伝子が発見できたため、平成25年度には残りの登録済みサンプルを用いてその関連を検証した。またARMS2遺伝子のA69S多型を検出するキットを改良し、すべての施設で検査可能にした。

【後ろ向き研究 - 光線力学療法】

各施設で光線力学療法を施行し、1年以上の経過観察が可能であった患者に対して、本研究の説明を行い、協力が得られた患者から同意のうえで血液サンプルを採取し、連結可能匿名化を行ったあとにAMD個別化医療研究会参加施設（京大、神戸大、埼玉医大、東京医療センター）に血液サンプルを送付し、DNA抽出を行い、抽出されたDNAを京大眼科に送付した。上述の抗VEGF治療の反応性に関連を認めた遺伝子について、各施設から得られた治療結果（有効性、視力予後、再発の有無）を参考に、治療結果に影響を与えうるかどうかを検証した。

（倫理面への配慮）

平成23年度中に本研究の協力施設15施設のすべてにおいて、倫理委員会の承認が得ら

れた。

末梢血の採取は通常臨床静脈採血と同様の方法で行われるので、それに伴う身体的・精神的不利益は小さいと考えられるが、採血時の身体的損傷・反応（まれにみられる迷走神経反射など）に対しては臨床的に適切とみなされる処置を遅滞なく行うことになっている。

遺伝子解析結果自体による倫理的・法的・社会的不利益は匿名化・情報管理の体制により防止する。また遺伝子解析を行うことに伴う心理的不利益に対してはヒト由来試料等採取機関により相談・情報提供の機会を提供する。

C．研究結果

【前向き研究 - 抗VEGF治療】

すべての施設での倫理委員会の承認を得た後、web上に作成した症例登録用ページに登録を開始し、256例を用いた研究で有力な候補遺伝子が発見できた。H25年度には再現性確認用に登録された200例を用いて再現性を確認したところ、7番染色体上の遺伝子について、統計学的に有意な関連は認めなかったが、同様の関連傾向を認めており、AMDの個別化医療に有用である可能性が高いと考えられる。

【後ろ向き研究 - 光線力学療法】

光線力学療法を施行済みの96例からDNAを抽出し、イルミナ社の2.5Mチップを用いた一塩基多型の検出が可能であった。現在、治療反応性・治療予後との関連を認める遺伝子を解明するために、ゲノムワイド関連解析を行っているが症例数が少なく、有意な遺伝子多型が発見出来なかった。抗VEGF治療の研究から得られた候補遺伝子についても有意な関連を認めなかった。

D．考察

抗VEGF治療の治療反応性・治療予後との関連を認める遺伝子の候補が見つかったと考えている。一方、光線力学療法については上述の遺伝子と治療反応性・治療予後との関連は認められなかったため、光線力学療法については既に知られているARMS2遺伝子の活用した個別化医療を行っていくべきであろう。

E．結論

光線力学療法および抗VEGF抗体治療の治療反応性・治療予後との関連を認める遺伝子が解明され、加齢黄斑変性の個別化医療の実現が近づいた。

F．健康危険情報

健康危険なし

G．研究発表

1. 論文発表

Ogino K, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Oishi A, Nakata I, Miyake M, Takahashi A, Ellabban AA, Yoshimura N. Multimodal evaluation of macular function in

- age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol*. 2014;58:155-65.
- Oishi M, Yamashiro K, Miyake M, Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Nakata I, Nakanishi H, Yoshikawa M, Oishi A, Gotoh N, Tsujikawa A, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Association between ZIC2, RASGRF1, and SHISA6 genes and high myopia in Japanese subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:7492-7.
- Miyake M, Yamashiro K, Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Nakata I, Nakanishi H, Oishi A, Tsujikawa A, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Vascular endothelial growth factor gene and the response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for choroidal neovascularization in high myopia. *Ophthalmology*. 2014;121:225-33.
- Nakata I, Yamashiro K, Kawaguchi T, Gotoh N, Nakanishi H, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Tsujikawa A, Oishi A, Saito M, Iida T, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Association between the cholesteryl ester transfer protein gene and polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:6068-73.
- Nakata I, Yamashiro K, Nakanishi H, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Tsujikawa A, Matsuda F, Yoshimura N. Prevalence and characteristics of age-related macular degeneration in the Japanese population: the Nagahama study. *Am J Ophthalmol*. 2013;156:1002-1009 e2.
- Khor CC, Miyake M, Chen LJ, Shi Y, Barathi VA, Qiao F, Nakata I, Yamashiro K, Zhou X, Tam PO, Cheng CY, Tai ES, Vithana EN, Aung T, Teo YY, Wong TY, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Matsuda F, Yong RY, Yap EP, Yang Z, Pang CP, Saw SM, Yoshimura N. Genome-wide association study identifies ZFHX1B as a susceptibility locus for severe myopia. *Hum Mol Genet*. 2013;22:5288-94.
- Miyake M, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Insulin-like growth factor 1 is not associated with high myopia in a large Japanese cohort. *Mol Vis*. 2013;19:1074-81.
- Miyake M, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Oishi M, Tsujikawa A, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Yoshimura N. Evaluation of pigment epithelium-derived factor and complement factor I polymorphisms as a cause of choroidal neovascularization in highly myopic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:4208-12.
- Miyake M, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Association of paired box 6 with high myopia in Japanese. *Mol Vis*. 2012;18:2726-35.
- Ueda-Arakawa N, Ooto S, Nakata I, Yamashiro K, Tsujikawa A, Oishi A, Yoshimura N. Prevalence and genomic association of reticular pseudodrusen in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2013;155:260-269.
- Ueda-Arakawa N, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Tamura H, Yoshimura N. Visual prognosis of eyes with submacular hemorrhage associated with exudative age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol*. 2012;56:589-98.
- Nakata I, Yamashiro K, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Kumagai K, Tsujikawa A, Liu K, Chen LJ, Liu DT, Lai TY, Sakurada Y, Yoneyama S, Cheng CY, Cackett P, Yeol IY, Tay WT, Cornes BK, Vithana EN, Aung T, Matsuo K, Matsuda F, Wong TY, Iijima H, Pang CP, Yoshimura N. Association of genetic variants on 8p21 and 4q12 with age-related macular degeneration in Asian populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:6576-81.
- Nakata I, Tsujikawa A, Yamashiro K, Otani A, Ooto S, Akagi-Kurashige Y, Ueda-Arakawa N, Iwama D, Yoshimura N. Two-year outcome of photodynamic therapy combined with intravitreal injection of bevacizumab and triamcinolone acetonide for polypoidal choroidal vasculopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251:1073-80.
- Tamura H, Tsujikawa A, Yamashiro K, Akagi-Kurashige Y, Nakata I, Nakanishi H, Hayashi H, Ooto S, Otani A, Yoshimura N. Association of ARMS2 genotype with bilateral involvement of exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2012;154:542-548 e1.
- Fan Q, Barathi VA, Cheng CY, Zhou X, Meguro A, Nakata I, Khor CC, Goh LK, Li YJ, Lim W, Ho CE, Hawthorne F, Zheng Y, Chua D, Inoko H, Yamashiro K, Ohno-Matsui K, Matsuo K, Matsuda F, Vithana E, Szelstad M, Mizuki N, Beuerman RW, Tai

ES, Yoshimura N, Aung T, Young TL, Wong TY, Teo YY, Saw SM. Genetic variants on chromosome 1q41 influence ocular axial length and high myopia. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002753.

Verhoeven VJ, Hysi PG, Saw SM, Vitart V, Mirshahi A, Guggenheim JA, Cotch MF, Yamashiro K, Baird PN, Mackey DA, Wojcicki R, Ikram MK, Hewitt AW, Duggal P, Janmahasatian S, Khor CC, Fan Q, Zhou X, Young TL, Tai ES, Goh LK, Li YJ, Aung T, Vithana E, Teo YY, Tay W, Sim X, Rudan I, Hayward C, Wright AF, Polasek O, Campbell H, Wilson JF, Fleck BW, Nakata I, Yoshimura N, Yamada R, Matsuda F, Ohno-Matsui K, Nag A, McMahon G, St Pourcain B, Lu Y, Rahi JS, Cumberland P M, Bhattacharya S, Simpson CL, Atwood L D, Li X, Raffel LJ, Murgia F, Portas L, Despriet DD, van Koolwijk LM, Wolfram C, Lackner KJ, Tonjes A, Magi R, Lehtimäki T, Kahonen M, Esko T, Metspalu A, Rantanen T, Parssinen O, Klein BE, Meitinger T, Spector TD, Oostra BA, Smith AV, de Jong PT, Hofman A, Amin N, Karssen LC, Rivadeneira F, Vingerling JR, Eiriksdottir G, Gudnason V, Doring A, Betcken T, Uitterlinden AG, Williams C, Zeller T, Castagne R, Oexle K, van Duijn CM, Iyengar SK, Mitchell P, Wang JJ, Hohn R, Pfeiffer N, Bailey-Wilson JE, Stribos D, Wong TY, Hammond CJ, Klaver CC. Large scale international replication and meta-analysis study confirms association of the 15q14 locus with myopia. The CREAM consortium. *Hum Genet.* 2012;131:1467-80.

Jirarattanasopa P, Ooto S, Nakata I, Tsujikawa A, Yamashiro K, Oishi A, Yoshimura N. Choroidal thickness, vascular hyperpermeability, and complement factor H in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:3663-72.

Oishi A, Yamashiro K, Tsujikawa A, Ooto S, Tamura H, Nakata I, Miyake M, Yoshimura N. Long-term effect of intravitreal injection of anti-VEGF agent for visual acuity and chorioretinal atrophy progression in myopic choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013;251:1-7.

Yamashiro K, Tomita K, Tsujikawa A, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Ooto S, Tamura H, Yoshimura N. Factors associated with the response of age-related macular degeneration to intravitreal ranibizumab treatment. *Am J Ophthalmol.*

2012;154:125-36.

Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Miyake M, Tsujikawa A, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and choroidal neovascularization in highly myopic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:2349-53.

Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Oishi A, Ooto S, Yamashiro K, Tamura H, Nakata I, Ueda-Arakawa N, Yoshimura N. Relationship between retinal morphological findings and visual function in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012;250:1129-36.

Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Otani A, Saito M, Iida T, Oishi A, Matsuo K, Tajima K, Matsuda F, Yoshimura N. Significance of C2/CFB variants in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:794-8.

Yamashiro K, Mori K, Nakata I, Tsuchihashi T, Horie-Inoue K, Nakanishi H, Tsujikawa A, Saito M, Iida T, Yamada R, Matsuda F, Inoue S, Awata T, Yoneya S, Yoshimura N. Association of elastin gene polymorphism to age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:8780-4.

Tomita K, Tsujikawa A, Yamashiro K, Ooto S, Tamura H, Otani A, Nakayama Y, Yoshimura N. Treatment of polypoidal choroidal vasculopathy with photodynamic therapy combined with intravitreal injections of ranibizumab. *Am J Ophthalmol.* 2012;153:68-80.

Nakata I, Yamashiro K, Nakanishi H, Tsujikawa A, Otani A, Yoshimura N. VEGF gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab and triple therapy in age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol.* 2011;55:435-43.

Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Tsujikawa A, Otani A, Saito M, Iida T, Oishi A, Matsuo K, Tajima K, Matsuda F, Yoshimura N. Association between the SERPING1 gene and age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese. *PLoS One.* 2011;6:e19108.

Tsujikawa A, Ojima Y, Yamashiro K, Nakata I, Ooto S, Tamura H, Nakanishi H, Hayashi H, Otani A, Yoshimura N. Association of lesion size and visual prognosis to polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol*. 2011;151:961-972.

Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Tsujikawa A, Otani A, Ooto S, Tamura H, Saito M, Saito K, Iida T, Oishi A, Kurimoto Y, Matsuda F, Yoshimura N. Genetic variants in pigment epithelium-derived factor influence response of polypoidal choroidal vasculopathy to photodynamic therapy. *Ophthalmology*. 2011;118:1408-15.

Hayashi H, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Kurashige Y, Tsujikawa A, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Ozaki M, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N. Association of 15q14 and 15q25 with high myopia in Japanese. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:4853-8.

Nakanishi H, Tsujikawa A, Yodoi Y, Ojima Y, Otani A, Tamura H, Yamashiro K, Ooto S, Yoshimura N. Prognostic factors for visual outcomes 2-years after intravitreal bevacizumab for myopic choroidal neovascularization. *Eye (Lond)*. 2011;25:375-81.

Tsujikawa A, Ojima Y, Yamashiro K, Ooto S, Tamura H, Nakata I, Yoshimura N. Development of polypoidal lesions in age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*. 2011;25:481-8.

2. 学会発表

富田香子、山城健児、辻川明孝、仲田勇夫、倉重由美子、大谷篤史、大音壮太郎、田村寛、中山嘉仁、吉村長久 加齢黄斑変性に対するRanibizumab硝子体注射の治療効果に影響する因子の検討 第115回日本眼科学会総会 2011.5.12-15 東京

仲田勇夫、山城健児、赤木由美子、三宅正裕、大石明生、辻川明孝、大谷篤史、大音壮太郎、田村寛、斎藤昌晃、飯田知弘、吉村長久 加齢黄斑変性発症とC2/CFb領域の遺伝子多型との相関 第116回日本眼科学会総会 2012.4.5-8 東京

山城健児、森圭介、本田茂、赤堀正和、米谷新、根木昭、岩田岳、吉村長久 加齢黄斑変性に対するルセンティス治療に関する多施設前向きゲノムワイド関連解析 第66回日本臨床眼科学会 2012.10.25-28 京都

三宅正裕、山城健児、中西秀雄、仲田勇夫、赤木由美子、熊谷京子、大石真秀、辻川明孝、

山田亮、松田文彦、吉村長久 ゲノムワイド一塩基多型で説明する近視のheritability 第117回日本眼科学会総会 2013.4.4-7 東京

三宅正裕、山城健児、中西秀雄、赤木由美子、大石明生、後藤謙元、辻川明孝、斎藤昌晃、栗本康夫、山田亮、松田文彦、吉村長久 加齢黄斑変性に対するルセンティス治療に関する多施設前向きゲノムワイド関連解析 第67回日本臨床眼科学会 2013.10.31-11.3 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

