

図2 基礎疾患 / 移植術式による眼圧上昇機序

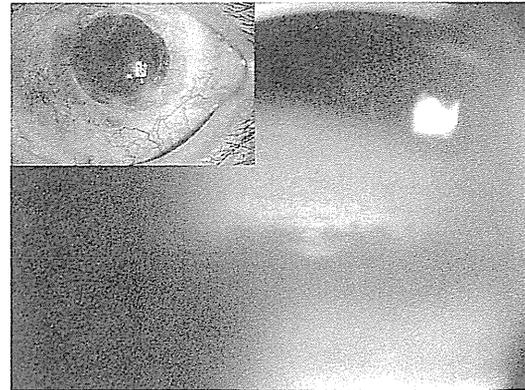


図3 移植後眼における隅角鏡観察所見

たはUBMのどちらかは必須となるが、隅角が透見できた症例であっても、可能であれば非接触 / 非侵襲で簡便に行える OCT は、前眼部の客観的な形状の経過を記録できるため測定しておくことが望ましい。

2. 緑内障の重症度の確認

視神経乳頭所見および視野検査を行う。角膜の状態が悪い場合でも Goldmann 動的視野検査を行っておく。細かな内部イソプタが測定できなくても、V-4-eのみでも大いに参考になる。

3. 眼圧の評価

角膜移植後眼は術後角膜の状態からしばしば Goldmann 圧平眼圧計での測定がむずかしい。Goldmann 圧平眼圧計では多少歪んでも中心の輪が内側で接触し、脈波が出ればおおよそ正しい眼圧と考えられる。また Goldmann 圧平眼圧計での測定が困難な場合でもアイケア眼圧計、トノペンなどを駆使して測定する。測定可能であれば、1種類の眼圧測定だけでなく、できれば複数種類の眼圧計で測定し、記録しておくことが望ましい。測定された眼圧が臨床的印象と異なる場合やどの眼圧計でも測定不能であった場合は触診で眼圧を確認し記録しておくことが大切である。

◎ポイント：角膜移植後眼の隅角観察

- ・光量を落とす
- ・範囲を絞る
- ・乱反射を防ぐ

2. 術式の選択

開放隅角もしくはステロイド緑内障の関与が疑われる場合は線維柱帯切開術を選択し、閉塞隅角もしくは炎症の関与が強い場合は線維柱帯切除術を選択する。部分的な閉塞隅角かつ隅角の透見性のある症例には線維柱帯切開術に隅角癒着分離術を併用する。よって術前の隅角評価は非常に重要となる。

3. 手技の実際

線維柱帯切開術 / 線維柱帯切除術において、基本は非角膜移植後眼と変わらない。主に線維柱帯切除術に関して、角膜移植後眼に施行する場合のポイントをあげる。

1. 結膜切開

化学外傷後や複数回の手術を繰り返した症例においては、結膜が強固に癒着している場合があり、結膜剝離の際、裂けたりピンホールを開けたりしないような注意が必要である。このような症例の結膜剝離に際しては、スプリング剪刀や鑷子での剝離は行わず、ゴルフメスを使用



図4 ゴルフメスでの癒着結膜剥離

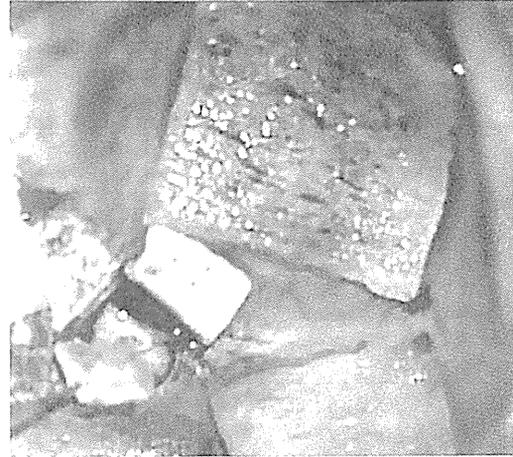


図5 線維柱帯切除部の開窓
角膜側に大きめに切り込んで、線維柱帯は大きく切除する。

し、場合によっては強膜の一部を結膜ごと剥離していく(図4)。

2. 強膜弁作成

出血が多く予想される場合には事前に強膜の止血凝固を丁寧に行っておく。術後の過剰濾過による浅前房を避けるために、浅層強膜の1/2層を目指した十分かつ均一な厚みでの強膜弁を作成する。

3. 線維柱帯切除

術後の炎症によってPASを起こしやすいので、線維柱帯切除の際には開窓部の閉塞を避ける目的で角膜側に大きめに切り込み(図5)、周辺虹彩切除は慎重に丁寧に施行する。

4. 強膜弁縫合

強膜弁はタイトに素早く縫合する。線維柱帯切除後の前房虚脱の時間は短いことが望ましい。場合によっては前房内に粘弾性物質を注入したり、前房メンテナーなどを併用する必要がある。縫合針は強膜弁下に貫通しないよう強膜弁の3/4層を目指して通糸し(図6a)、強膜弁が一方に引きつれたり歪んだりしないよう心がける(図6b)。強膜弁には不用意に穿通部を作成しないように、最低限(縫い直しのない)の通糸/縫合数での縫合を心がける。

5. 前房洗浄

過度な水流による前房洗浄は内皮細胞脱落の可能性があるので、避けるべきである。

6. 結膜縫合

免疫抑制薬使用による易感染性という特殊な環境下にあるため、結膜の薄い濾過胞にならないよう、Tenon嚢を奥から引き出して結膜の裏打ち(図7)をしておくことが望ましい。

Advanced Techniques

マイトマイシンC使用後の洗浄の際に、十分Tenon嚢に水分を含ませ膨化させておく(図8)と、結膜縫合の際に扱いやすくなる。

◎ポイント：角膜移植後眼の線維柱帯切除術のポイント

- ・強膜弁の厚みは十分厚く、薄くならないように作成
- ・線維柱帯切除の開創部は大きめに作成
- ・周辺虹彩切除は慎重に丁寧に施行
- ・強膜弁はタイトに縫合
- ・結膜縫合時はTenon嚢で裏打ち

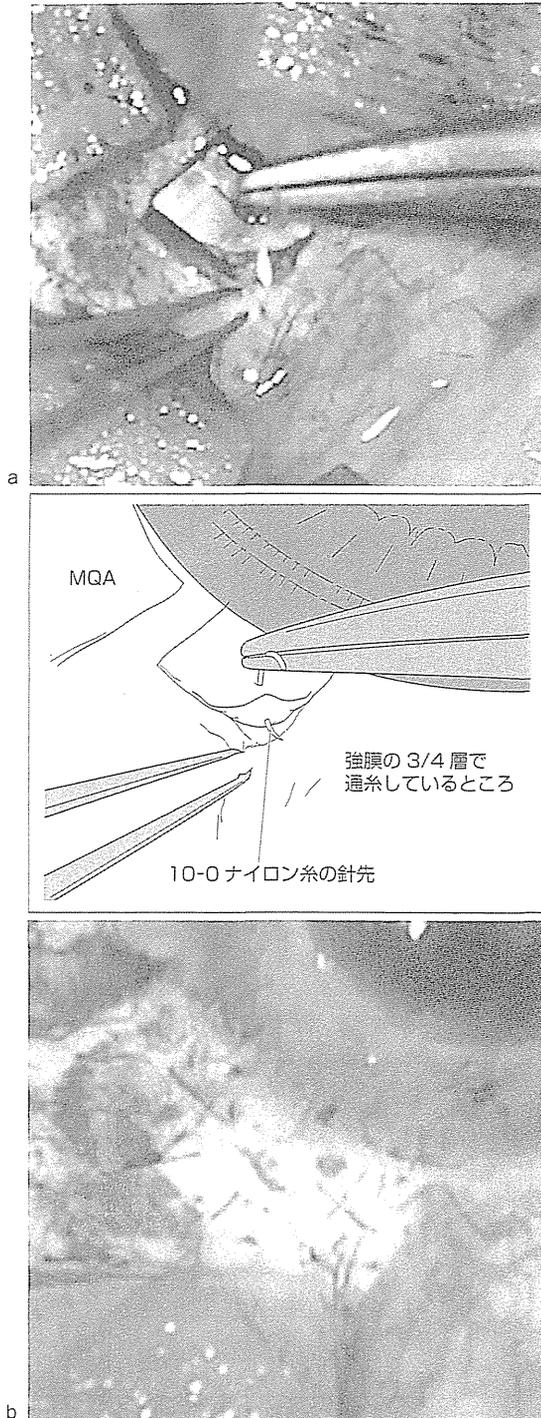


図6 強膜弁縫合

a 縫合針は強膜弁下に貫通せず、強膜弁の3/4層を目指して通糸

b 強膜弁が一方に引きつれたり歪んだりしないよう心がける。

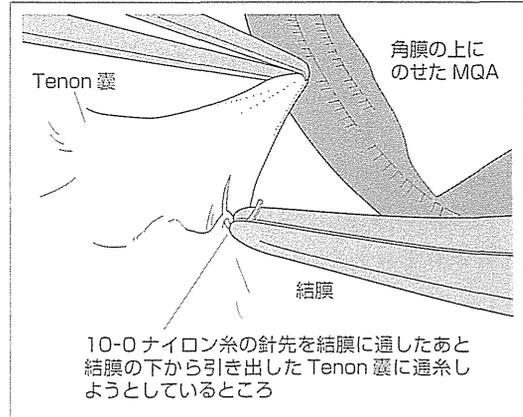


図7 Tenon 嚢の結膜裏打ち

Tenon 嚢を引き出して結膜に裏打ちして縫合する。

4. 周術期管理

線維柱帯切開術 / 線維柱帯切除術のどちらの術式を行う場合でも、角膜移植片の拒絶反応抑制と消炎維持が重要となる。

1. ステロイド薬の使用

手術直前からベタメタゾン1mg/day 内服開始、炎症の程度をみながら術後3～7日使用したのち中止する。また移植原疾患がレーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症のように炎症が非常に強く起こると予想される症例(高リスク症例)では術前にコハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム(ソル・メドロール®)125mg 点滴静注を行う。ソル・メドロール®使用により、術中の

フィブリン析出や術後の眼圧上昇や周辺虹彩前癒着などが抑制される。

ステロイド点眼は翌日からベタメタゾン点眼を基本4回/日、前房内炎症が強い症例には6回/日で行う。

2. 免疫抑制薬の使用

シクロスポリン(ネオオーラル[®])内服(1~2mg/kg/day)を2~4週内服させる。炎症が強いと予想される症例には術前日から開始しておくことが望ましい。ただし内服中は2週おきにシクロスポリンのトラフ値での血中濃度と腎機能をチェックしなければならない。

◎ポイント：移植後眼に対する緑内障手術

周術期管理のポイント

- ・ステロイド薬の内服
- ・免疫抑制薬の内服
- ・免疫抑制薬使用中の血中濃度管理および腎機能チェック

◎ポイント

- ・ソル・メドロール[®]の選択理由：強力な消炎効果があり、即効性があることと、リンデロン[®]に比較して半減期が短く、作用が長引かないため使いやすい

5. 術後合併症と対策

基本的には通常の線維柱帯切開/線維柱帯切除術と同じである。角膜移植後の特殊な術後合併症としては角膜移植片拒絶反応である。拒絶反応が起きた場合には、まず角膜内皮後面に沈着物が連なったラインが観察される。拒絶反応でなくとも炎症で角膜後面沈着物が付着する可能性があるが、拒絶反応との鑑別はホスト側にも角膜後面沈着物があれば炎症、グラフトのみに存在する場合は拒絶反応の可能性が高いため、慎重に観察する。まずはこれらの徴候を見逃さないことが大切で、拒絶反応を疑った場合の対処は成書に譲る。ただし、近年は免疫抑制薬の使用により、拒絶反応がかなり抑えられるよう

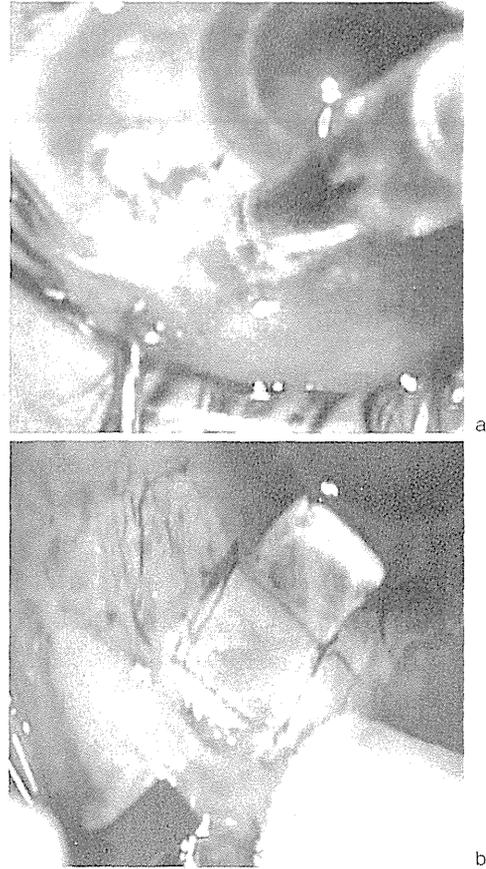


図8 Tenon囊の膨化
水分を含ませて膨化させると扱いやすい。

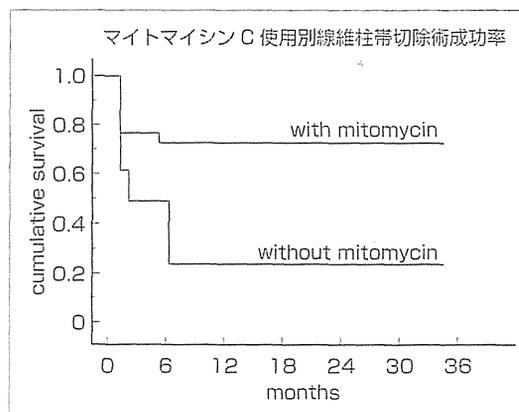


図9 角膜移植後線維柱帯切除術の手術成績
マイトマイシンC使用線維柱帯切除術のほうが不使用の線維柱帯切除術よりも手術成績が良い。

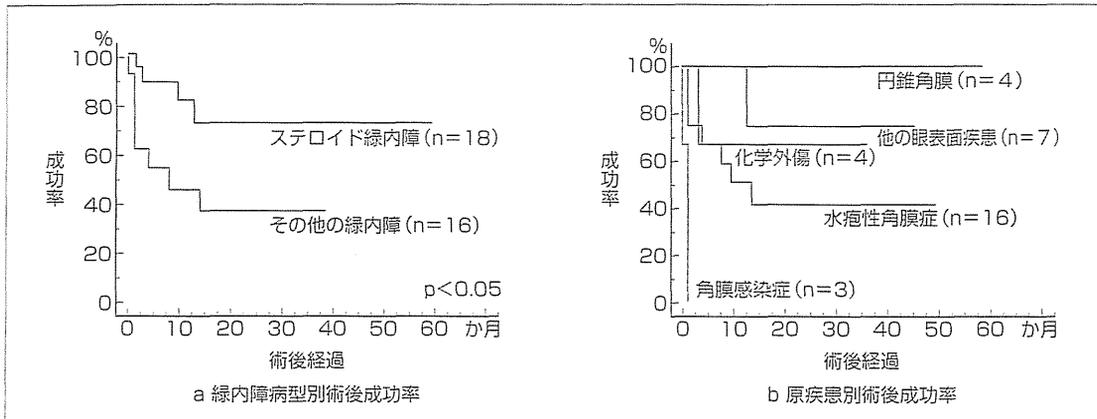


図10 当科における角膜移植後緑内障手術成績

aは病型別, bは原疾患別であるが, このaの病型別のステロイド緑内障が線維柱帯切開術, その他の緑内障が線維柱帯切除術を行っているため, 術式別と一致している。

になっている。当科における33例34眼(平均年齢 60.1 ± 17.8 歳, 平均経過観察期間 29.6 ± 24.1 か月)の角膜移植後の緑内障手術成績の報告⁴⁾においても, 拒絶反応を起こした症例は存在しなかった。

●ポイント：術後合併症対策のポイント

- ・角膜移植片拒絶反応の初期徴候を見逃さない

6. 手術成績

角膜移植後の線維柱帯切除術の手術成績としてIshioka⁴⁾は32例34眼の角膜移植後眼におけるマイトマイシンC使用の線維柱帯切除術で73.0%, マイトマイシンC使用せずの線維柱帯切除術で25.0%と報告している(平均経過観察期間 22.3 ± 10.3 か月)(図9)。当科における33例34眼の角膜移植後の緑内障手術成績⁵⁾を図10a, bに示した。aは病型別, bは原疾患別である。全症例の3年での成功率は55%であった。術式別では線維柱帯切開術66%, 線維柱帯切除術39%と線維柱帯切除術の成功率が低かったが, 2つの術式で有意差は認めなかった。よって角膜移植後眼では全例に線維柱帯切除術を行うのではなく, 隅角観察および眼圧上昇機転を明らかにした上で, 線維柱帯切開術の適応

がある症例に関しては線維柱帯切開術を行うほうが術後成績は良い傾向にあり望ましいと考えられる。

おわりに

角膜移植前にはしっかりと眼圧をコントロールしておくことが大切で, すでに抗緑内障点眼が多剤使用されている場合は, 移植前に緑内障手術を施行すべきである。角膜移植後, 緑内障手術が必要になった場合の手術術式としては, 移植片透明性維持の面から線維柱帯切開術が推奨される。また周術期には拒絶反応抑制のためにステロイドやシクロスポリン内服などの免疫抑制薬を併用することが大切である。⁶⁾

文献

- 1) Foulks GN : Glaucoma associated with penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 94 : 871-874, 1987
- 2) Chien AM, et al : Glaucoma in the immediate postoperative period after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 115 : 711-714, 1993
- 3) Jeffrey JJ, et al : Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 105 : 1855-1865, 1998
- 4) Ishioka M, et al : Trabeculectomy with mitomycin for postkeratoplasty glaucoma. *Br J Ophthalmol* 84 : 714-717, 2000
- 5) 荒木やよいほか : 角膜移植後緑内障に対する緑内障手術成績の検討. *眼科手術* 19 : 229-232, 2006

140. 緑内障 Genome-Wide Association Study 最新の知見：1. どう見て、どう考えるか

池田陽子*1 中野正和*2 森 和彦*1
京都府立医科大学大学院医学研究科
*1 視覚機能再生外科学 *2 同 ゲノム医科学

疾患の原因遺伝子を発見するためには、かつては家系から割り出す連鎖解析が行われていたが、2002年開始の国際HapMap計画を契機にマイクロアレイを用いるGenome-Wide Association Study (GWAS)の時代となった。本稿では、GWASの歴史と同定された緑内障遺伝子について解説する。

●緑内障関連 GWAS の歴史

ヒトゲノム上の300万箇所及ぶ一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) をすべて列挙することを目的とした国際HapMap計画により、マイクロアレイの飛躍的な技術革新と解析費用の価格崩壊が起こり、Genome-Wide Association Study (GWAS) は急速な進歩を遂げた。緑内障関連では落屑緑内障 (exfoliation glaucoma : XFG) に対する *LOXLI* (2007年 : 300K)¹⁾ の発見や、その後引き続いて筆者らの広義原発開放隅角緑内障 (POAG) の報告 (2009年 : 500K)²⁾ を経て、現在は1,000Kアレイによる研究が進んでいる。GWASのまとめを図1に、主要2社のマイクロアレイを図2に示す。

●GWASで同定された緑内障遺伝子

1. *LOXLI* (XFG)

北欧グループが報告したXFGの *LOXLI*¹⁾ は弾性線

維であるエラスチンの重合を触媒する。人種を超えて幅広く再現性が認められたが、*LOXLI*の1つのSNP (rs1048661) ではアジア人と白人とでリスクアレルが逆転、つまり危険と保護の正反対の作用を有していることが判明したため、今後のさらなる解明が待たれる。

2. *ZP4, PLXDC2, TMTC2* (POAG)

筆者らが同定したPOAGに関連するSNP²⁾の近傍に位置する遺伝子であり、機能は不明である。いずれも相対危険度が1.3前後と小さいため、POAGが多因子疾患であることを浮き彫りにした結果となった。現在のところ他人種では再現性が認められていないが、少ないサンプル数による検出力不足のためか、人種差のためかは今後の解析が待たれる。

3. *CAVI, CAV2* (POAG)

アイランドの白人で報告されたSNP³⁾の近傍遺伝子で、細胞膜内存在構造体の主要構成成分であるカベオリンをコードする。このSNPは日本人においてはバリエーションではなく、人種差が存在している。また、相対危険度

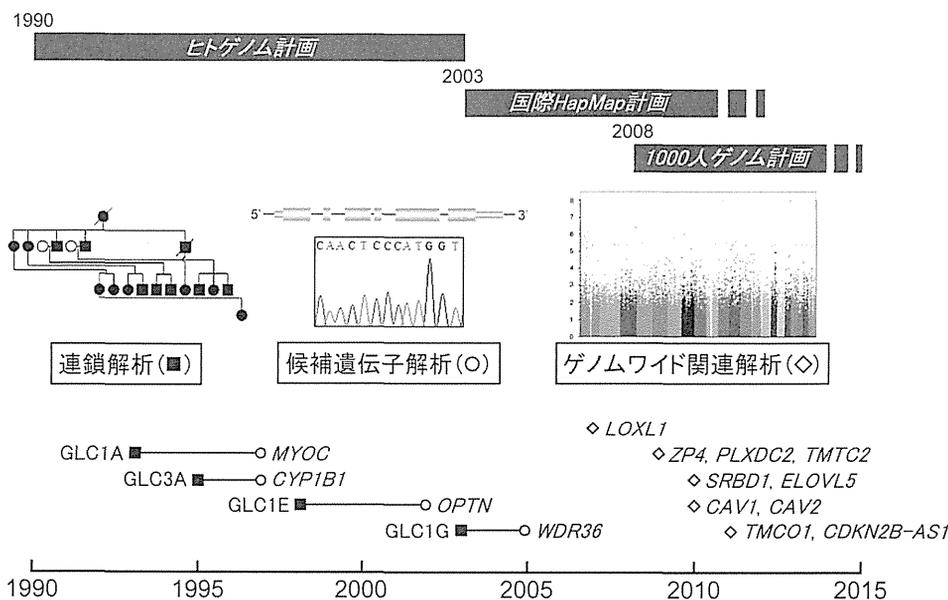


図1 GWASの時代背景と同定された緑内障遺伝子

GWASに至るまでは、遺伝子解析の手法は連鎖解析および候補遺伝子解析が主であった。しかしながら、1990年からのヒトゲノム計画が終了し、2003年に国際HapMap計画が始まってからGWAS解析手法が著しく進歩し、アレイの価格崩壊が起こったため、国家プロジェクトでなくとも参入が可能となりGWASの時代となった。

表 1 GWAS で同定された緑内障関連領域と近傍遺伝子

病 型	人 種	染色体領域	遺伝子	報告年	文献
落屑緑内障	白人 (アイスランド人)	15q24	<i>LOXLI</i>	2007	1)
原発開放隅角緑内障 (広義)	アジア人 (日本人)	1q43	<i>ZP4</i>	2009	2)
		10p12	<i>PLXDC2</i>		
		12q21	<i>TMTC2</i>		
正常眼圧緑内障	アジア人 (日本人)	2p21	<i>SRBD1</i>	2010	5)
		6p12	<i>ELOVL5</i>		
原発開放隅角緑内障	白人 (アイスランド人)	7q31	<i>CAV1</i>	2010	3)
			<i>CAV2</i>		
原発開放隅角緑内障	白人 (オーストラリア人)	1q24	<i>TMCO1</i>	2011	4)
			9p21		

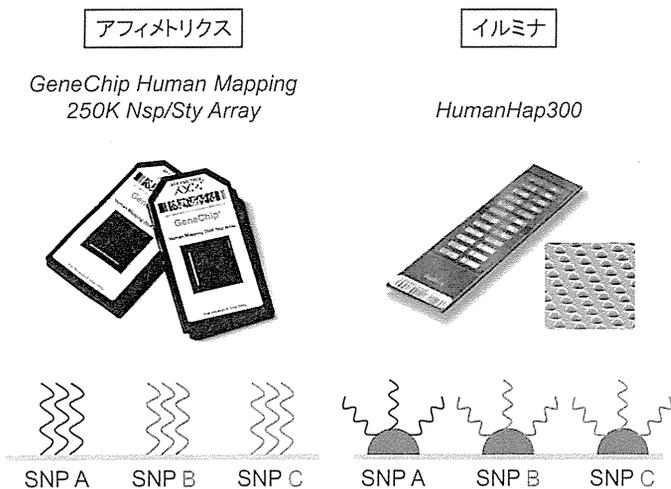


図 2 GWAS に用いるマイクロアレイ

GWAS に用いるマイクロアレイは米国企業のアフィメトリクス社 (左) とイルミナ社 (右) の2つのアレイが主流となっている。前者はプローブが基盤に直接固着化されているのに対して、後者はビーズ上に固着化されているのが特徴である。

が1.36であり、白人においても POAG が多因子疾患であることを示した。

4. *CDKN2B-AS1*, *TMCO1* (POAG)

オーストラリア人で報告された遺伝子⁴⁾で、SNP の相対危険度はそれぞれ1.50および1.68であった。*CDKN2B-AS1* が存在する 9p21 領域は心疾患・糖尿病など、多種多様な疾患の発症にかかわる領域であることが報告され、イギリス白人健常人での視神経乳頭サイズおよび垂直陥凹にかかわる遺伝子である *CDKN2B* もこの領域に存在する。

5. *SRBD1*, *ELOVL5* (NTG)

日本人正常眼圧緑内障 (NTG) で報告され⁵⁾、細胞増殖抑制やアポトーシスにかかわることが示唆されている。同じ日本人で NTG のみならず狭義 POAG での再

現性も報告されている。

●ま と め

GWAS にて同定された緑内障関連領域と近傍遺伝子を表 1 にまとめた。大規模 GWAS を行えば統計学的に関連する SNP は同定できるが、多因子疾患の場合には相対危険度が高くアミノ酸置換を伴う遺伝子上の機能的 SNP よりも、相対危険度が低く遺伝子の発現調節にかかわる遺伝子外の SNP が同定されることが多い。今後はこれらの結果を「遺伝子砂漠」に埋もれさせるのではなく、次世代シーケンサーを用いたさらなる解析にてその意義を明らかにしてゆく必要がある。

文 献

- 1) Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P et al : Common sequence variants in the *LOXLI* gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 317 : 1397-1400, 2007
- 2) Nakano M, Ikeda Y, Taniguchi T et al : Three susceptible loci associated with primary open-angle glaucoma identified by genome-wide association study in a Japanese population. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 : 12838-12842, 2009
- 3) Thorleifsson G, Walters GB, Hewitt AW et al : Common variants near *CAV1* and *CAV2* are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat Genet* 42 : 906-909, 2010
- 4) Burdon KP, Macgregor S, Hewitt AW et al : Genome-wide association study identifies susceptibility loci for open angle glaucoma at *TMCO1* and *CDKN2B-AS1*. *Nat Genet* 43 : 574-578, 2011
- 5) The Normal Tension Glaucoma Genetic Study Group of Japan Glaucoma Society : Genome-wide association study of normal tension glaucoma : common variants in *SRBD1* and *ELOVL5* contribute to disease susceptibility. *Ophthalmology* 117 : 1331-1338, 2010

141. 緑内障 Genome-Wide Association Study 最新の見解：

中野正和*1 池田陽子*2 森 和彦*2

京都府立医科大学大学院医学研究科
*1 ゲノム医科学 *2 同 視覚機能再生外科学

2. 次世代シーケンサーをいかに活用するか

最近、緑内障に関連する塩基配列の違い（バリエーション）がゲノムワイド関連解析（Genome-Wide Association Study：GWAS）によりつきつぎに同定されている。統計学的に関連付けられたバリエーションと緑内障の病態とをつなぐ分子機序の解明がつぎの課題であり、次世代シーケンサーの有効活用が期待される。

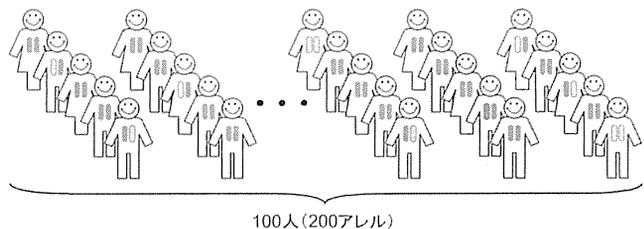
●遺伝子砂漠の生物学的役割

DNA マイクロアレイを用いた Genome-Wide Association Study (GWAS) によって、現在までにさまざまな多因子疾患に関連する何千ものバリエーションが同定されている。当初その勢いは“gold rush”といわれた¹⁾。しかし、筆者らが報告した原発開放隅角緑内障²⁾をはじめ大多数の疾患では、オッズ比の低い (1.2~1.5) バリエーションが近傍に遺伝子の存在しない“gene desert (遺伝子砂漠)”から発見された。すなわち、統計学的に疾患に関連付けられたバリエーションがどのように疾患の病態にかかわっているのか、その分子機序を解明する難問は今もなお残されている。

つい最近までヒトゲノムの3%未満しか占めていない遺伝子をコードする配列から蛋白質が翻訳されることが生命現象の根幹であるとされ、それ以外のゲノム配列は“ジャンク (がらくた)”とさえよばれていた。しかし、ゲノム全体にわたるトランスクリプトーム (ある瞬間に発現している一次転写産物の総体) 解析³⁾によって、現在では蛋白質に翻訳されない配列も遺伝子の発現調節などの重要な役割を担っていることが知られている。したがって、GWASで報告された遺伝子砂漠にも生物学的に何らかの意味のある配列が潜在し、その配列上のバリエーションが疾患の病態に関与している可能性が高い。現在、遺伝子砂漠の生物学的役割として、1) rare (まれな) バリエーション、2) 調節配列/マイクロRNA、3) エピジェネティックマーク、のいずれかによる遠隔遺伝子の発現調節機構の存在が示唆されている (図1)。そして、いずれの仮説を検証するためにも領域全体にわたる高精度な塩基配列情報の取得が必須となる。

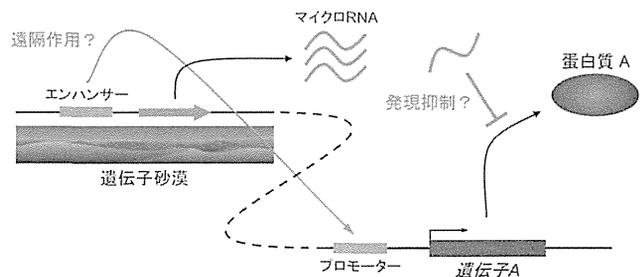
1. rareバリエーション

○: commonバリエーション (アレル頻度>1%; 下図の場合、10/200アレル= 5%)
●: rareバリエーション (0.1%<アレル頻度<1%; 下図の場合、1/200アレル= 0.5%)



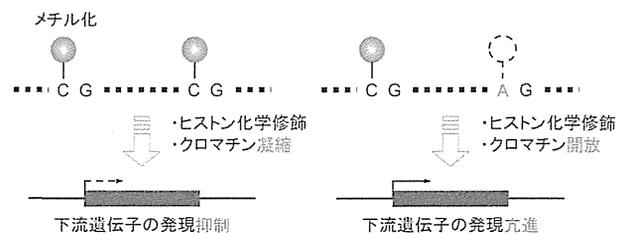
DNA マイクロアレイによる GWAS では、対象母集団でのアレル頻度が 1% 以上で認められる common (ありふれた) バリエーションが検出できるように至適化されている。一般的にオッズ比が高いアレル頻度が 1% 未満の rare (まれな) バリエーションの検出にはシーケンサーデータによる検証が必要である。

2. 調節配列/マイクロRNA



遺伝子砂漠には、未知のエンハンサーやマイクロRNAをコードする配列が存在し、遠隔遺伝子の発現を調節している可能性がある。

3. エピジェネティックマーク



遺伝子砂漠には、特定の塩基配列 (目印、マーク) に対する化学修飾 (たとえばCGと並んだ塩基配列のCへのメチル化) による機構 (エピジェネティクス) が存在し、周辺のクロマチン (DNAを巻き付けているヒストン蛋白質とDNAの複合体) の構造変化を誘導することによって遺伝子の発現を制御している可能性がある。

図1 遺伝子砂漠領域の生物学的役割

1) rare バリエーション、2) 調節配列/マイクロRNA 配列、3) エピジェネティックマーク、が潜在している可能性が高い。

●次世代シーケンサーの活用

次世代シーケンサー(図2)の登場により、そのデータ産生量とカバー率の高さ(=精度)から、広範囲にわたるゲノム領域をこれ以上ない解像度(塩基配列)で解析できるようになった。したがって、次世代シーケンサーを活用することで上述した仮説(図1)の検証が可能になってきている。

最近、次世代シーケンサーを用いたポストGWAS研

究として、冠動脈疾患に関連する遺伝子砂漠(9p21)を題材とした例が報告された⁴⁾。本研究では次世代シーケンサーを用いて領域内の塩基配列を決定後、1) rareバリエーションを含めた全バリエーションの抽出、2) 調節配列予測プログラムによるエンハンサーの推定、3) Chromosome conformation capture (3C) 法(図3)によるエンハンサーの標的配列の同定、を行っている。興味深いことにエンハンサー配列予測の結果、9p21は全ゲノムの遺伝子砂漠のなかでエンハンサーが2番目に高密度な領

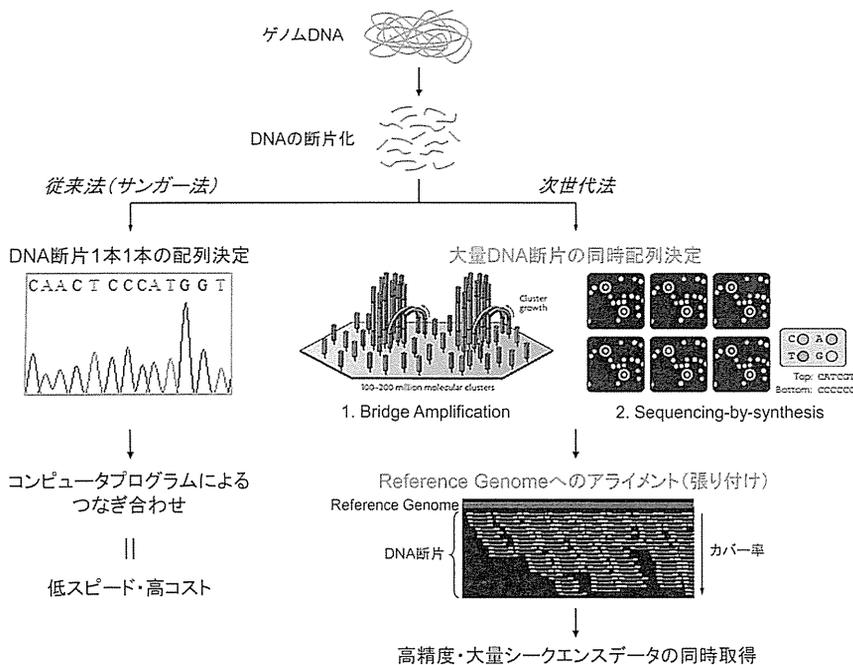
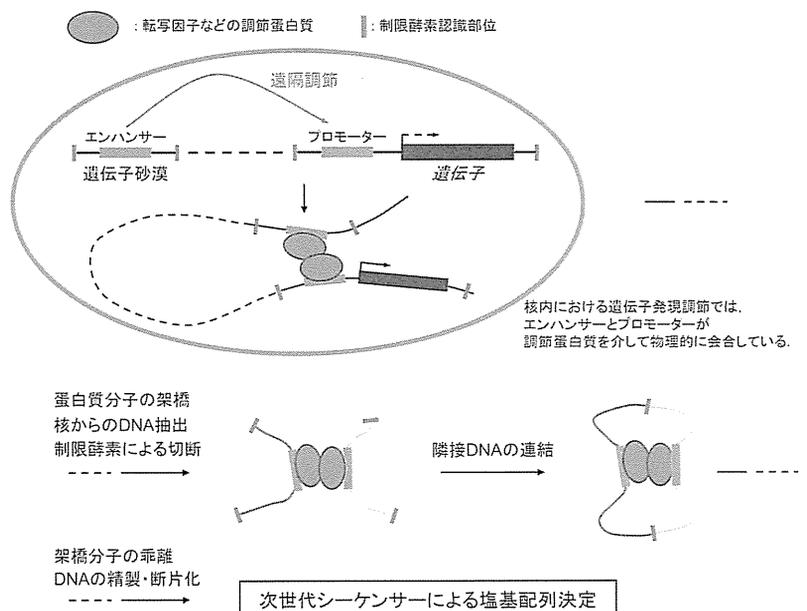


図2 シーケンサーの技術革新

次世代シーケンサーでは、1) 一度に大量のDNA断片の塩基配列を決定(詳細な原理については文献5を参照)し、2) 個々のDNA断片の塩基配列をReference Genome(ヒトゲノムプロジェクトで決定され現在も更新され続けている標準配列)に貼り付けて“答え合わせ”をすることで、高精度なシーケンスデータを短時間で取得できる。

図3 Chromosome conformation capture 法
頭文字にCが3つ連続するので“3C”ともよばれる。エンハンサーとプロモーターが調節蛋白質を介して物理的に会合する現象を利用して、実際に核内で相互作用している両者の塩基配列を決定することができる。(文献6より転載、一部改変)



域であることが判明し、本領域が多数の遠隔遺伝子の発現を調節する中継地点の役割を担っていることが示唆された。また、冠動脈疾患に関連するバリエーションを含むエンハンサー配列の転写因子 STAT1 への結合能がリスクアレルの有無によって異なることを細胞レベルで示し、さらにこのエンハンサーが約 950 kb も離れた *IFNA21* 領域を始め、複数の遺伝子領域と会合していることを 3C 法 (図 3) で明らかにした。以上の結果は、統計学的に疾患と関連付けられたバリエーションの機能を初めて分子レベルで捉えた画期的な成果である。

今後、本研究例のように次世代シーケンサーを活用しながら GWAS で同定された多数の疾患の発症機序の糸口が“第 2 の gold rush”としてつぎつぎに得られることが期待される。

文 献

- 1) Topol EJ, Murray SS, Frazer KA : The genomics gold rush. *JAMA* **298** : 218-221, 2007
- 2) Nakano M, Ikeda Y, Taniguchi T et al : Three susceptible loci associated with primary open-angle glaucoma identified by genome-wide association study in Japanese population. *Proc Natl Acad Sci USA* **106** : 12838-12842, 2009
- 3) Carninci P, Kasukawa T, Katayama S et al : The transcriptional landscape of mammalian genome. *Science* **309** : 1559-1563, 2005
- 4) Harismendy O, Notani D, Song X et al : 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. *Nature* **470** : 264-268, 2011
- 5) Metzker ML : Sequencing Technologies—the next generation. *Nat Genet* **11** : 31-46, 2010
- 6) 三浦 尚, Crutchley J : 3C 法による核内 DNA の位置関係の解析. *実験医学* **28** : 1433-1440, 2010

☆

☆

☆