

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

眼内血管新生病の遺伝子解析と抗血管新生治療に対する
個別化医療の確立

研究代表者 森 圭介(埼玉医科大学 医学部 眼科学)

研究分担者 栗田 卓也¹⁾, 樺沢 昌²⁾, 田北 博保²⁾,
大崎 昌孝¹⁾, 米谷 新²⁾

緒言

加齢黄斑変性(AMD)は欧米の失明原因の第一位を占めており、本邦でも急激に増加し現在失明原因の第四位に位置し、今後もさらに増加するとされている疾患である。AMDは生活習慣病で高齢者に発症するため、本邦における生活習慣の欧米化や高齢化社会の形成に伴い増加する。現在マスメディアでも多く取り上げられるようになり、社会問題になりつつある疾患である。AMDでは脈絡膜新生血管を介して黄斑部網膜が破壊されることで、黄斑部機能は著しく低下し、非可逆性の視力低下に至る。糖尿病網膜症とならび、眼内血管新生を介する病理変化で失明に陥る疾患で、眼内血管新生病と総称されるが、その重篤性や罹患患者の多さから、眼内血管新生を征することは眼底疾患を征することと評されている。実際、眼内血管新生は1990年代より世界中の眼科・視覚領域の研究者の中心的トピックスとなっており、また、これら多くの研究者の研鑽により光線力学療法(PDT)や抗VEGF療法などの新しい治療法が開発され、現在多くの患者に福音を与えつつある。

現在PDTや抗VEGF抗体を使った抗血管新生療法は現実のものとなっており、その有効性も臨床的に証明されている。一方、AMDでは、眼内新生血管が生じている時には既に網膜に対する非可逆性の障害が生じてしまっていることが多い。従って、究極の治療法は、これらの病態の原因遺伝子を突き止め、将来的に発症のリスクを予測すると共に、発症リスクの高い患者に対し、原因遺伝子をコントロールする治療法と言える。AMDの疾患感受性遺伝子については、様々な候補遺伝子との関連が検討されてきたが、最近特に米

国のCaucasianを対照とした研究において大きな進展が見られた。具体的には、DNAアレイによる網羅的遺伝子多型の解析により、補体活性化第二経路の制御因子の1つである1番染色体上の補体H因子(CFH)のアミノ酸置換を行うSNP(Y402H)とCaucasianでのAMDの発症との強い関連が示された。これに加え、最近セリンプロテアーゼ遺伝子の1つ(HTRA1)がAMDの二番目の原因遺伝子として報告された。一方、日本人のAMDのphenotypeはCaucasianのそれと異なることが指摘されており、特にCFH Y402Hに関しては、欧米の報告と全く異なる結果が本邦の複数のグループから報告されている。このため、日本人特有の疾患感受性遺伝子を検索することは極めて有用な情報をもたらすことが期待される。

疾患感受性遺伝子についての研究のもう一つの大きな課題として、各種の治療法との関連を検討すること、つまり個別化医療(personalized medicineもしくはindividualized medicine)が挙げられる。個別化医療は、各医療分野で注目され、現在最も活発な研究がなされているトピックスのうちのひとつである。個別化医療とは、患者個人の持つ分子・遺伝情報をもとに、治療効果を最大化しかつ副作用を最小化する治療計画を立案・実行することと定義されている。メディアでも、オーダーメイド医療、もしくはテーラーメイド医療という名称で数多く取り上げられている。ちなみにオーダーメイドは「和製英語である」こと、テーラーメイドは「特権階級意識を感じさせる」との理由から嫌われて、最近はpersonalized またはindividualizedが使われることが多い。個別化医療の代表的な適応として癌の化学療法があるが、近年眼科領域でもこれに関連する研究データが出てきている。

以上のような経緯・背景のもと、本研究においては、日本人AMDにおけるPhenotypeとGenotypeの特徴を

1) 埼玉医科大学 医学部 内分泌 糖尿病内科
2) 埼玉医科大学 医学部 眼科学

明らかにするとともに, PDT, 抗 VEGF 抗体の抗血管新生療法に関する個別化医療を確立するため, AMD において, 治療効果と各遺伝子の SNP との関連を検討した。

方法

本研究は, 埼玉医科大学倫理委員会の承認の下, 文書によるインフォームドコンセントが得られた埼玉医科大学病院眼科受診者を対象とした。Case 408 名, Control 142 名より末梢血を採取しゲノム DNA を精製して解析に用いた。AMD の病態としては, 滲出型 AMD, ポリープ状脈絡膜血管症 (PCV), 萎縮型 AMD の 3 型に分類した。コントロール群とした AMD 非罹患患者は, AMD の他, 他の網膜・脈絡膜疾患を有さない, 罹患群とマッチする年齢層の人を対象とした。個人を特定する情報は埼玉医科大学病院眼科において管理し, RI 部門においてはサンプルと個人情報とを切り離して解析を行った。SNP 解析は, 塩基の違いにより発色する蛍光色素が異なるようにデザインされたプローブによる PCR 解析, TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ (Applied Biosystems 社) を用いて行った。調査した遺伝子および SNP は, complement factor H (CFH) 遺伝子の四つの SNP (rs800292, rs1061170, rs1410996, rs2274700), high-temperature requirement factor A1 (HTRA1) 遺伝子の rs11200638, vascular endothelial growth factor 遺伝子の三つの SNP

(rs699947, rs1570360, rs2010963), および pigment epithelium-derived factor (PEDF) 遺伝子の四つの SNP (rs12150053, rs12948385, rs9913583, rs1136287) とした。

結果

408 名の AMD 患者のうち, 373 名 (91.4%) が滲出型 AMD であり, 残りの 35 名 (8.6%) が萎縮型 AMD であった。滲出型 AMD のうち, 219 名は典型的な滲出型 AMD (58.7%), 154 名 (8%) が PCV であった。すべての AMD, 典型的な滲出型 AMD, PCV, 萎縮型 AMD は, コントロールに比べ有意高齢であった ($p < 0.001$)。また, 男性の有病率は, すべての AMD, 典型的な滲出型 AMD, PCV, 萎縮型 AMD の順で, 76.7, 73.1, 79.2, 88.6% で, それぞれコントロールよりも大幅に高かった ($p < 0.0001$)。

調査した SNP のうち, 発症と有意な関連のあったものは, CFH の rs800292, rs1410996, rs2274700, HTRA1 rs11200638 であった。これらの 4 つの SNP を組み合わせた場合, 最も低い発症リスクを持つ SNP の組み合わせと, 最も高い発症リスクを持つ SNP の組み合わせとを比べると約 70 倍相当のリスク差があった (図 1)。また, PDT に対する治療効果に関しては, HTRA1 rs11200638 が最も高い予測効果をもたらす genetic biomarker であることが明らかとなった (図 2)。

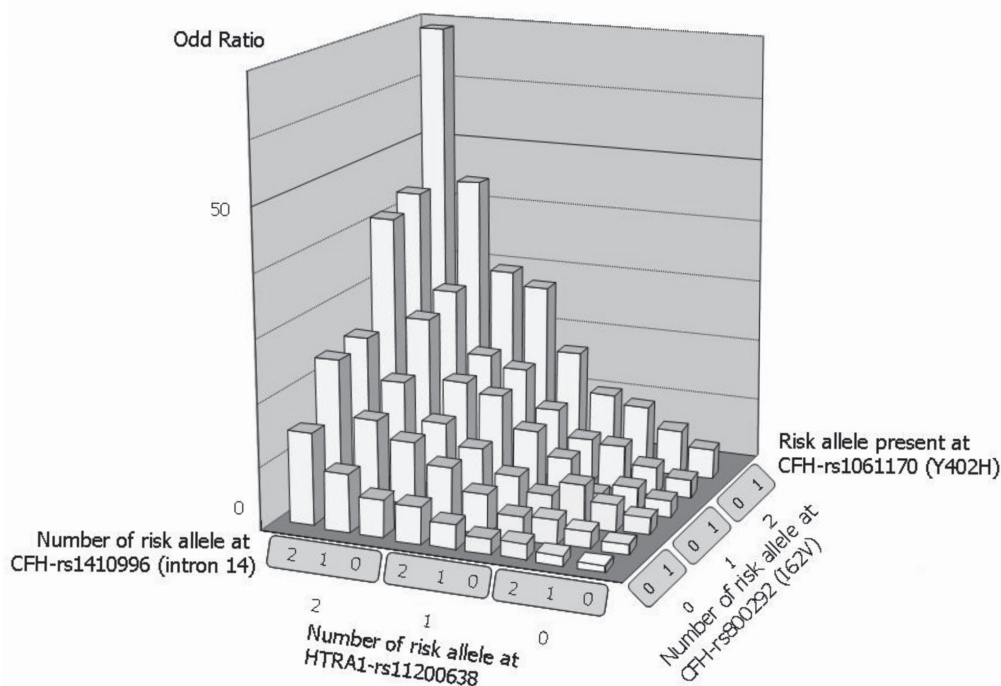


図 1. Joint effects among CFH-rs800292, -rs1061170, -rs1410996 and HTRA1 genotypes for the risk of AMD development. from Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Takita H, Kabasawa S, Kawasaki I, Ohkubo T, Kurihara S, Iizuka H, Miyashita Y, Katayama S, Awata T, Yoneya S, Inoue S. Phenotype and genotype characteristics of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology* 2010;117:928-38.

考按

結果で示したこれらの遺伝子情報がどのように臨床にかかわってくるかが、当然一番問題となるところである。これら遺伝子解析の臨床的な目的は二つあり、ひとつは病態の理解ひいては治療法の開発であり、もうひとつは個々の症例におけるリスク管理であろう。まず、病態の理解だが、例えばAMDにおいてCFH Y402HのCアレルの数が多いほどAMDに罹患しやすいことは上述したが、この場合、402番目のアミノ酸がヒスチジンに置き換わることで、CFH蛋白としての機能が劣化する。CFHは補体系の代替経路の抑制機能を担っており、CFHの機能が劣化することは、代替経路を介して補体系が容易に活性化する環境が成立していると考えられる。この他の事実として、C2, C3, CFBなどの他の補体系分子の遺伝子多型がAMD発症と関連していることが報告されており、遺伝子多型の研究により、補体系を介した炎症がAMD発症に重要な役割を果たしていることはほぼ間違いのない事実として認識されるようになった。また、日本人を代表とするアジア人種では、HTRA1/ARMS2が特に重要であるが、その機能解析ではまだ議論があり、今後の研究に注目したい。加えて、狭義AMDとPCVのサブタイプ解析においては、エラスチン遺伝子におけるハプロタイプ解析でPCVと狭義AMDの間に差がある

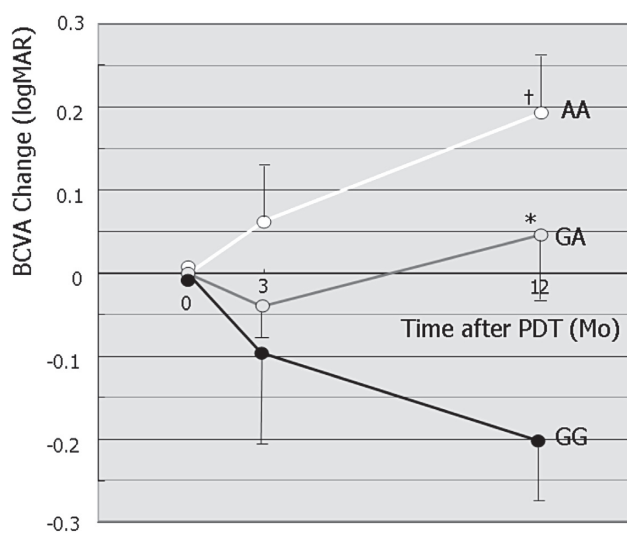


図 2. Mean logMAR vision change from baseline by patients with the HTRA1 genotype (open circle: AA, gray circle: GA, solid circle: GG) over the follow-up period. Improvement in BCVA among the HTRA1 genotypes was significantly different 12 months after PDT (* wild-type homozygous (GG) vs heterozygous (GA): $p=2.97 \times 10^{-2}$, wild-type homozygous (GG) vs risk allele homozygous (AA): $p=7.00 \times 10^{-4}$, Bonferroni multiple comparison correction). Bar, SE.

From Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, et al. *Ophthalmology* 2010 (in press).

と報告されている。このことはエラスチンがAMDとPCVの病態を形成する上で、一役担っている可能性を示唆するものである。

もうひとつの目的である個々の症例におけるリスク管理だが、一般に、1) 予防、2) 診断利用、3) 治療効果の予測、4) 治療における副作用の予測、の4つとされている。予防に関しては、集団検診や希望者における遺伝子検査で各疾患になりやすい人を見つけ、疾患になりにくいような生活習慣を指導したり、早期発見に努めるよう定期受診を勧めたりすることができる。今回の自験例 550 名における遺伝子解析では、いくつかの遺伝子多型を組み合わせると、リスクの高い人はそうでない人に比べて、70 倍のオーダーでAMDに罹患しやすくなるという結果が出ている。このようなハイリスク群は当然予防的指導が必要と考えられる。特に日本人AMDの場合、ドルーゼンのような前駆病変を必ずしも伴うとは限らないので、現在までの検査法では発症リスクを読むのには限界がある。従って、予防医学的にもぜひとも遺伝子検査法の確立が待たれる。

診断利用としては、病気の確定診断やその性格を調べるのに利用されている。AMDを代表とする眼科疾患の場合、他の内科的疾患に比べ、診断は比較的容易でかつ正確にできるため、遺伝子検査の補助はあまり必要ないが、重症度の予測には遺伝子解析が有用である。日本人AMD (PCVを含む) では、HTRA1-rs11200638のリスクアレルを多く持つ人ほど病変サイズが巨大化しやすく、また、特にPCVではARMS2 A69Sのリスクアレルを多く持つ人ほど大量出血による硝子体出血を来しやすいと報告されている。

治療効果の予測に関しては、欧米を中心にいくつかのデータが報告されている。米国と英国の住民における光線力学療法 (PDT) 治療効果との関連はCFH Y402HとARMS2 A69Sで示されたが、フィンランドの住民からの報告では関連がないと報告されている。また、抗 VEGF 療法に関してもCFH Y402HとARMS2 A69Sの関連が米国から報告されている。残念ながら、現時点ではこのように報告によって意見が分かれており、統一された見解はないが、少なくとも今回のデータは日本人における初めてのものであり、AMDの病型や治療予後は人種間、特にCaucasianとAsianでは異なることが指摘されていることから、独自の重要性を持つものと解釈される。このように、本邦独自の個別化医療に関する指標を確立することが近々の重要な課題であろう。

おわりに

現在、例えば流行性角結膜炎の診断に抗原抗体反応を応用したクロマトグラフィを実際の臨床現場で使用するように、またぶどう膜炎の診療でHLAのタイピングをするように、AMD診療で遺伝子検査を行う

ようになる日もそう遠くはないと研究代表者は期待している。しかしながら、日本人を含むアジア人のAMDは、遺伝子型・表現型ともに欧米人のそれとはかなり異なるため、欧米主導型のデータを鵜呑みにすることはできない。そのため、日本人眼科医による日本人AMD患者のための遺伝型・表現型の関連データを出し続けること、しかもできるだけ多くの症例で、きちんとしたものを、可能なら多施設でまとめることが必須であり、またわれわれ日本人眼科医の責務であると研究代表者は考える。

研究成果リスト

論文

1. 上山数弘, 森圭介, 米谷新. 光線力学療法でのポリプ状脈絡膜血管症の異常血管網の変化. 臨床眼科 2009;63:511-4.
2. Tsuchihashi T, Mori K, Peyman G, Shimada Y, Yoneya S. Photodynamic effects on retinal oxygen saturation, blood flow, and electrophysiological function in patients with neovascular age-related macular degeneration. Retina. 2009;29:1450-6.
3. 森圭介. 加齢黄斑変性のリスク遺伝子と個別化医療の可能性. 眼科 2009;51:1647-52.
4. Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Takita H, Kabasawa S, Kawasaki I, Ohkubo T, Kurihara S, Iizuka H, Miyashita Y, Katayama S, Awata T, Yoneya S, Inoue S. Phenotype and genotype characteristics of age-related macular degeneration in a Japanese population. Ophthalmology 2010;117:928-38.
5. 土橋尊志, 森圭介, 米谷新. 視力良好な滲出型加齢黄斑変性に対する光線力学療法の治療成績. 日眼会誌 2010;114:7-13.
6. 土橋尊志, 森圭介, 上山数弘, 大和史, 米谷新. 滲出型加齢黄斑変性に対する光線力学療法の長期成績. 臨眼 2010;64:531-5.
7. Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Takita H, Kueyama K, Okazaki Y, Inoue S, Awata T, Katayama S, Yoneya S. Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration. Ophthalmology 2010 (in press).

学会発表

1. 田北博保, 森圭介, 樺澤昌, 土橋尊志, 上山数弘, 飯塚裕幸, 栗田卓也, 堀江公仁子, 井上聡, 米谷新. 日本人加齢性黄斑変性症 (AMD) とポリプ状脈絡膜血管症 (PCV) の発症関連遺伝子と眼底病変の関連. 第112回日本眼科学会総会. 2008.04.パシフィコ

横浜.

2. 樺澤昌, 森圭介, 川崎いづみ, 大崎昌孝, 飯塚裕幸, 栗田卓也, 米谷新. 加齢黄斑変性とポリプ状脈絡膜血管症の生活環境因子との関連. 第112回日本眼科学会総会. 2008.04.パシフィコ横浜.
3. 土橋尊志, 森圭介, 樺澤昌, 田北博保, 上山数弘, 堀江公仁子, 井上聡, 飯塚裕幸, 栗田卓也, 米谷新. 加齢黄斑変性に対する光線力学療法の治療効果に関する遺伝因子. 第112回日本眼科学会総会. 2008.04.パシフィコ横浜.
4. Hiroyasu Takita, Keisuke Mori, Sho Kabasawa, Takashi Tutihashi, Kazuhiro Ueyama, Hiroyuki Iizuka, Takuya Awata, Kuniko Horie, Satoshi Inoue, Peter L. Gehlbach, Shin Yoneya. CFH and HTRA1 Gene Polymorphisms Correlate With Age-related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy but not Heterogeneity in Their Clinical Characteristics in a Native Japanese Population. 2008 ARVO Annual Meeting .2008.4. (Fort Lauderdale, Florida).
5. S. Kabasawa, K. Mori, K. Ueyama, H. Omata, S. Yoneya. Age and Cigarette Smoking, But Not Gender, Moderately Influence the Risk of AMD and PCV in a Japanese Population. 2008 ARVO Annual Meeting .2008.4. (Fort Lauderdale, Florida).
6. 森圭介, 米谷新. 加齢黄斑変性における遺伝子多型と個別化医療. 第10回 JAPAN Macula Club. 8/23/2008, 蒲田市.
7. 樺澤昌, 森圭介, 上山数弘, 大崎昌孝, 飯塚裕幸, 栗田卓也, 米谷新. 血中脂肪酸分画を含む生活環境因子の加齢黄斑変性発症への関与. 第47回日本網膜硝子体学会・第25回日本眼循環学会合同学会. 2008.11. 国立京都国際会館.
8. 田北博保, 森圭介, 樺澤昌, 土橋尊志, 上山数弘, 飯塚裕幸, 栗田卓也, 堀江公仁子, 井上聡, 米谷新. 日本人加齢黄斑変性におけるフルオレセイン蛍光造影の分類と発症関連遺伝子の関連. 第113回日本眼科学会総会. 2009.04. 東京国際フォーラム.
9. 森圭介, 堀江公仁子, 樺澤昌, 土橋尊志, 田北博保, 今井大介, 栗田卓也, 井上聡, 米谷新. 日本人加齢黄斑変性の表現型・遺伝子型の特徴. 第63回日本臨床眼科学会. 2009.10. 博多. 福岡国際会議場・福岡サンパレス・マリンメッセ福岡.
10. 大野京子, 森圭介, 石田晋, 相原一, 雑賀司珠也. インストラクションコース. Bench to bedside. 基礎研究を敬遠していませんか? 第63回日本臨床眼科学会. 2009.10. 博多.
11. 今井大介, 森圭介, 米谷新. 加齢黄斑変性への bevacizumab の治療効果と遺伝子多型 AMD. 第48回日本網膜硝子体学会総会・第26回日本眼循環学

- 会・第15回日本糖尿病眼学会総会.2009.12.名古屋国際会議場.
12. 森圭介, 大谷篤史, 飯島裕幸, 高橋寛二, 安川力, 尾花明, 松本容子. インストラクションコース13. 加齢黄斑変性の治療戦略. 第33回日本眼科手術学会総会. 2010.1.22-24. 東京国際フォーラム.
13. 森圭介. 特別講演. 加齢黄斑変性と光線力学的療法の過去・現在・未来. 第11回山梨網膜研究会. 山梨古名屋ホテル. 2010/3/4.
14. Mori K. Distinguished Invited Lecture. Antiangiogenic protein delivery mediated by viral vectors. In BIT's Annual International Congress of Antibodies. March 24-26, 2010. Beijing, China.
- 特許出願
本学整理番号 : 埼玉特21-019
出願番号 : 特願2009-298772
出願日 : 平成21年12月28日
出願人 : 井上聡, 井上公仁子, 森圭介, 米谷新
発明の名称 : 加齢黄斑変性症易罹患性の判定マーカー並びに判定方法及び判定キット.