

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

## 網羅的遺伝子多型解析とゲノム情報に基づく 加齢黄斑変性原因遺伝子の解明と機能解析

研究代表者 井上(堀江) 公仁子

(埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子情報制御部門 埼玉医科大学 眼科学)

共同研究者 森 圭介<sup>1)</sup>, 神田 将和<sup>2)</sup>, 井上 聡<sup>3)</sup>

### はじめに

加齢黄斑変性(AMD)は、欧米において失明原因の第一位である加齢に伴う眼科疾患であり、本邦においても罹患者数が急激に増加しており、高齢化社会における社会問題になりつつある。眼球をカメラに例えるならば、AMDとは高感度フィルムにあたる網膜中心部の黄斑部と暗箱にあたる脈絡膜の組織間において、老廃物の沈着(ドルーゼン形成)とその処理に伴い生じる免疫炎症反応により惹起するものと考えられる。さらに病状が進行すると、黄斑部に脈絡膜新生血管が発生し、網膜・脈絡膜間のバリア機構が破壊されることによって黄斑部機能は著しく低下し、急激な視力低下に至る。AMDの発症には、先進国における生活環境による影響も考えられるとともに、いくつかの遺伝的素因が複合的に関与していると考えられてきた。

疾患原因遺伝子の探求を行うにあたり、ヒトゲノム解読が終了した昨今において、ゲノム情報の蓄積に伴い、一塩基遺伝子多型(SNP)を用いたDNAアレイによるゲノムワイドな網羅的遺伝子多型解析が可能になってきた。また、人種別のSNP解析情報を元に進行しつつある国際的ハプロタイプヒトゲノムマップ計画(HapMapプロジェクト)により、特定のSNPおよび近傍のSNPにおける頻度の推定や、遺伝において同じ挙動を示すことが予想される遺伝子領域(ハプロタイプブロック)の情報取得が公開データベースにより可能となってきている。このような状況下において、2005年米国の複数の研究グループより、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)について、アミノ酸置換を行うSNP(Y402H)と

白人におけるAMDの発症が強く相関することが発表された<sup>1,4)</sup>。そのうちの1報<sup>1)</sup>は、10万個サイズのDNAアレイ(100 Kアレイ)を用いた解析とHapMapデータの利用により、CFHの遺伝子多型との相関を特定したものである。CFHはAMDにおいてドルーゼン形成にかかわる蛋白であることも免疫組織化学的に明らかになったが、そのY402H多型はCFHがヘパリンやC反応性蛋白と結合する領域に存在することから、発症群において多いCアレルでは、補体系抑制機能が低下することが予想された。また、第二のAMD関連遺伝子座として、10番染色体長腕(10q26)領域が報告されてきたが<sup>5,6)</sup>、最近その近傍に位置するセリンプロテアーゼ遺伝子の1つ(HTRA1)<sup>7,8)</sup>もしくはミトコンドリアに発現する遺伝子ARMS2<sup>9)</sup>が原因遺伝子として注目されている。

白人におけるAMD関連遺伝子解析の結果に追従するように、黄色人種におけるAMD遺伝子解析においても、CFH多型や10q26領域の多型とAMDの相関性についても報告されているが、一方では日本人におけるAMDは白人のAMDとは異なる病型をとることが知られてきた。白人ではドルーゼン形成が主体で脈絡膜新生血管がないdry AMDと呼ばれる病型が主流であるのに対して、日本人では脈絡膜新生血管を伴う滲出性のwet AMDの病型と、特に男性に多く白人種には稀なポリープ状脈絡膜血管症(PCV)という病型の2つが主流である。従って、日本人においては、白人種と同じ遺伝子変異がAMDに発症に寄与している可能性がある一方で、白人とは異なる遺伝子の関与により異なる病態の修飾を生じ、表現型に大きな差が生じている可能性が考えられる。日本人に重要なAMD原因遺伝子を同定することにより、AMDの人種間差をもたらす因子とその病態への作用が明らかになり、さらに日本人に対して特に効果的であるAMDの分子標

1) 埼玉医科大学 眼科学

2) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター TR部門

3) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子情報制御部門

的治療が可能になると考えられる。

このような背景のもと、本研究は、埼玉医科大学病院眼科受診したAMD罹患者および非罹患者における遺伝子多型解析を行い、ゲノムデータベース情報を活用して日本人のAMD発症に関連する遺伝子の探索を行った。

## 研究方法

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て末梢血サンプルを提供いただき、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非罹患者は、AMDの他、他の網膜・脈絡膜疾患を有さない、罹患者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、ゲノム医学研究センターにおいてはサンプルと個人情報を切り離して解析を行った。本研究開始時において、解析可能な対象数はAMD罹患者群189例、コントロール群135例であり、そのうちの男性比率は、罹患者群76.2%、コントロール群51.9%、年齢は、罹患者群71.2±8.5(平均値±SD)歳、コントロール群68.1±9.7歳であった。

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ジェノタイプングアッセイ(Applied Biosystems社)を用いて行った。

## 研究結果と考察

本研究において、10q26領域のHTRA1遺伝子プロモーター多型が日本人AMD罹患者性と特異的に関連することを明らかにした[研究成果参照]。この結果は、2006年末に米国より発表された白人種および米国在住中国人におけるHTRA1遺伝子プロモーター多型のAMD関連性を初めて日本人においても確認するものであり、本研究結果は、米国国立バイオテクノロジー情報センター提供のヒト遺伝病データベース(OMIN)にも収録され、インターネット上に公開された。転写因子の結合部位に関連するHTRA1遺伝子プロモーター多型については、HTRA1の発現量をコントロールする可能性が米国の研究グループにより報告されている<sup>7)</sup>。HTRA1の発現量と疾患の関連性については、変形性関節症の軟骨におけるmRNAの高発現が報告されており、HTRA1と炎症との関連性が考えられている<sup>10)</sup>。また、HTRA1はインスリン様成長因子<sup>11)</sup>やTGF- $\beta$ 系因子<sup>12,13)</sup>へ直接作用することも推測されており、細胞増殖や腫瘍増殖をコントロールする可能性も考えられている。

他方、10q26領域においては、HTRA1遺伝子上流

にLOC387715/ARMS2遺伝子が存在すると考えられており、最近、この遺伝子がミトコンドリアに発現する可能性が報告された<sup>9)</sup>。LOC387715/ARMS2遺伝子のnonsynonymous SNPであるA69S多型は、10q26領域におけるAMD感受性のマーカーとして、早くから報告されてきたものである。ARMS2遺伝子のミトコンドリアにおける機能は明らかではないが、老廃物が細胞内で処理・消化されるにあたっては、ミトコンドリアのエネルギー代謝にも依存することから、この遺伝子の多型がAMDの発症で重要である可能性も考えられている。

さらに、候補遺伝子アプローチとして、補体系遺伝子のAMD罹患関連性について検討を行った。C型肝炎における肝線維化の関連遺伝子として報告があるC5について<sup>14)</sup>、肝線維化に重要と考えられる多型として、エクソン19のnonsynonymous SNPであるrs17611、イントロン27にあるSNP rs1035029、およびイントロン39にあるSNP rs2300929の解析を行ったところ、アレル頻度とAMD罹患との関連性は、カイ二乗検定においてそれぞれ $P = 0.22$ 、 $P = 0.26$ 、 $P = 0.84$ であり、今回の集団においてはいずれも有意差は得られなかった。補体系とAMD罹患関連性については、1q32領域のCFH遺伝子とその周辺に位置するCFH関連遺伝子群<sup>15,16)</sup>の他、CFHと同様に補体活性化第二経路における制御因子のB因子(BF)遺伝子および近接するC2遺伝子<sup>17,18)</sup>、C3遺伝子<sup>19,20)</sup>などについて報告がある。C5については、AMD患者に発生する網脈絡膜ドルーゼンの免疫染色において、C3とともに発現が認められており、また実験的に活性型C5であるC5aの受容体遺伝子をノックアウトしたマウス(C5aR<sup>-/-</sup>マウス)の眼底にレーザー傷害を与えた場合、血管新生因子VEGFの発現が低下し、脈絡膜新生血管の発症が抑えられることが示されている<sup>21)</sup>。現在までの検討では、C5遺伝子多型とAMD罹患の関連性については明らかではないが、さらに詳細なC5遺伝子周辺SNP多型の検討を行い、またC3遺伝子多型、C3aとC5aの受容体遺伝子多型の検討を行うことは、AMD発症における種々の補体系遺伝子の意義付けを明らかにできるものとして重要と考えられる。

## おわりに

AMD疾患感受性遺伝子としては、現在のところCFHとHTRA1またはARMS2が重要であることが報告されてきたが、未だ日本人にwet AMDならびにPCVの病型が多い理由については明らかになっていない。AMDの治療法については、新生血管退縮を目的とした光線力学的療法、血管新生抑制のための抗VEGF抗体(アバスタチンなど)眼内注入、炎症抑制のためのステロイド剤(トリアムシノロンなど)の局所投与などの併用により、一時代昔に比較して格段に進歩したと

言えるが、費用の面で医療費負担は少なくない。また、病期進行後の治療では視力の回復が図れない場合もあり、高齢者のQOLを維持するためには、最も早期発見早期治療が必要な疾患の一つと考えられる。本研究により、日本人におけるAMD易罹患者の遺伝子多型が明らかになれば、高齢者の健康維持を行える面においても、医療費増大を抑制できる面においても、重要な意義があると考えられる。本研究を進展させ、既知の疾患感受性遺伝子を含め複数の遺伝子多型を組み合わせることにより、AMD発症を性格に予測するシステムを構築し、さらに将来的には疾患感受性遺伝子をターゲットとした比較的安価で効果的な新しい治療・薬剤の開発への応用を目指したい。

## 謝 辞

本研究は、平成18年度埼玉医科大学学内グラントおよび平成17-19年度文部科学省学術フロンティア推進事業の支援により行われた。研究推進にあたり、埼玉医科大学医学部眼科・米谷新教授、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター・村松正實前所長ならびに岡崎康司所長に貴重な助言をいただいたことを深謝する。

## 研究成果リスト

### 論文

Mori K, Horie-Inoue K, Kohda M, Kawasaki I, Gehlbach PL, Awata T, Yoneya S, Okazaki Y, Inoue S. Association of the HTRA1 gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2007;52(7):636-41.

### 学会発表

堀江公仁子, 森圭介, 神田将和, 樺沢昌, 川崎いずみ, 大崎昌孝, 飯塚浩幸, 粟田卓也, 岡崎康司, 井上聡, 米谷新

CFHおよびHTRA1プロモーター遺伝子多型による加齢黄斑性症罹患リスクの検討

第61回臨床眼科学会. 2007.10 京都

### 特許出願

学内番号：埼玉特19-002

発明の名称：加齢黄斑変性症の発症リスクの予測方法  
井上聡, 井上公仁子, 森圭介, 米谷新, 神田将和, 岡崎康司

出願日：2007.7.26

## 参考文献

- 1) Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308(5720):385-9.
- 2) Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor

- H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 2005 308(5720):421-4.
- 3) Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308(5720):419-21.
- 4) Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(20):7227-32.
- 5) Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet.* 2005;14(21):3227-36.
- 6) Schmidt S, Hauser MA, Scott WK, Postel EA, Agarwal A, Gallins P, et al. Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet.* 2006;78(5):852-64.
- 7) DeWan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science.* 2006;314(5801):989-92.
- 8) Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science.* 2006;314(5801):992-3.
- 9) Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KE, Brooks M, Khanna R, et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(41):16227-32.
- 10) Hu SI, Carozza M, Klein M, Nantermet P, Luk D, Crowl RM. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem.* 1998;273(51):34406-12.
- 11) Zumbunn J, Trueb B. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett.* 1996;398(2-3):187-92.
- 12) Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M, Koshiba-Takeuchi K, Ina J, Yano M, et al. HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development.* 2004;131(5):1041-53.
- 13) Hadfield KD, Rock CF, Inkson CA, Dallas SL, Sudre L, Wallis GA, et al. HtrA1 inhibits mineral

- deposition by osteoblasts: requirement for the protease and PDZ domains. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5928-38.
- 14) Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, et al. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet.* 2005;37(8):835-43.
- 15) Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(10):1173-7.
- 16) Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al. Deletion of CFHR3 and CFHR1 genes in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2008;17(7):971-7.
- 17) Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(4):458-62.
- 18) Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(9):1055-9.
- 19) Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, et al. Genetic Factors in AMD Study Group. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2007;357(6):553-61.
- 20) Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, Schnetz-Boutaud N, Scott WK, Gallins P, et al. C3 R102G Polymorphism Increases Risk of Age-related Macular Degeneration. *Hum Mol Genet.* 2008 Mar 6 [Epub ahead of print]
- 21) Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, et al. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2328-33.