

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

## 糖尿病網膜症，加齢黄斑変性症の遺伝子解析：PEDF および CFH 遺伝子を中心として

研究代表者 粟田 卓也（埼玉医科大学 内分泌・糖尿病内科）

研究分担者 森 圭介<sup>1)</sup>，栗原 進<sup>2)</sup>，大崎 昌孝<sup>2)</sup>，樺沢 昌<sup>1)</sup>

### 緒言

疾患の発症に関与する遺伝子(疾患感受性遺伝子)を同定することは、疾患の発症機序を明らかにする上で有用であるのみならず、その予知、リスク評価、予防、オーダーメイド医療への展開においても重要である。成人の失明の二大原因である糖尿病網膜症と加齢黄斑変性症は有効な治療法が少なく、その疾患感受性遺伝子を明らかにすることは特に重要と考えられる。糖尿病網膜症は最近の糖尿病患者の急増により増加しており、視力に重要な黄斑部の障害を来す黄斑浮腫(黄斑症)あるいは異常血管新生を来す増殖網膜症が失明の原因となる。加齢黄斑変性症は高齢人口の増加に伴いわが国でも急増しており、黄斑部の病変(萎縮あるいは出血・滲出)のために高度な視力障害を来す。

糖尿病網膜症の疾患感受性遺伝子に関しては、これまでアルドース還元酵素(ALR2)、糖化最終産物受容体(RAGE)などの遺伝子多型との関連が報告されてきた。われわれは糖尿病網膜症の病態形成に強く関与する増殖因子として血管内皮増殖因子(VEGF)に注目し、研究を進めてきた。VEGFは、黄斑部の毛細血管の透過性亢進により生ずる黄斑症の病因としても注目されている。われわれは、VEGF 遺伝子のC-634G多型と網膜症および黄斑症との有意な関連を見出し<sup>1,2)</sup>、内皮細胞機能に重要なeNOS 遺伝子の27 bp 繰り返し多型およびT-786C多型と黄斑症との有意な関連を見出した<sup>3)</sup>。さらに最近、網膜色素上皮細胞などから豊富に産生され、神経網膜の保護に重要であるとともに強力な血管新生抑制因子である色素上皮由来因子(PEDF)に着目した<sup>4)</sup>。PEDFは血管透過性亢進の抑制作用<sup>5)</sup>、VEGFの発現抑制および抗炎症作用<sup>6)</sup>もあり、VEGFと拮抗的に働く糖尿病網膜症・黄斑症の発症の重要な阻止因子と考えられる。

一方、加齢黄斑変性症の疾患感受性遺伝子についても種々の候補遺伝子との関連が検討されてきたが、最近大きな進展が認められた。補体活性化の代替経路の抑制因子である補体因子H(CFH)との関連がScience誌に相次いで報告され<sup>7,9)</sup>、その後の追試でも高度な関連が確認された。以前から加齢黄斑変性症の前駆病変として黄斑部に認められるドルーゼンには補体成分が検出されており、関連の機序として、加齢、喫煙、感染などの環境因子がtriggerとなり惹起された補体活性化による慢性炎症の遷延が推察される。さらに、セリンプロテアーゼHTRA1の遺伝子多型も疾患感受性遺伝子として最近同定された<sup>10,11)</sup>。

### 対象と方法

2型糖尿病患者416例、加齢黄斑変性患者188例、コントロール139例を対象とし、書面による同意を得た上で、血液からDNAを抽出した。遺伝子多型の決定は、PCR-RFLP法あるいはTaqMan法により行った。各多型と、糖尿病網膜症・黄斑症、加齢黄斑変性症との関連の遺伝学的検討は、case-control 関連解析、および臨床指標を加味した多重ロジスティック回帰分析により行った。また、個々の多型に関してHardy-Weinber 平衡の検定を行うとともに、各遺伝子の多型間の連鎖不平衡検定、ハプロタイプ解析を行った。

### 結果と考察

#### 1. 糖尿病網膜症とPEDF 遺伝子多型との関連<sup>12)</sup>

(1)PEDF多型のうち、プロモーター領域に存在するC-5740T(rs12150053)とA-5308G(rs12948385)が強い連鎖不平衡を形成し、網膜症および黄斑症と有意に関連していた。(2)ハプロタイプ解析では、-5740C/-5308A/-4879C/72Metが網膜症および黄斑症と有意に関連し、それ以外のハプロタイプは関連を認めなかった。(3)臨床的指標を加味

1) 埼玉医科大学 眼科， 2) 埼玉医科大学 内分泌・糖尿病内科

したロジスティック回帰分析でも、C-5740TとA-5308Gは網膜症および黄斑症の有意な危険因子であった(C-5740Tについて、それぞれ、オッズ比2.3,  $p = 0.0002$ ; オッズ比2.2,  $p = 0.006$ , Table 1). (4) VEGF多型C-634G(rs2010963)も網膜症の有意な危険因子であったが(オッズ比1.6,  $p = 0.005$ ), PEDF多型C-5740TとVEGF多型C-634Gは独立した危険因子であり、組み合わせるとオッズ比は7.06に増加した(Table 2). VEGFとPEDFが相加的に糖尿病網膜症・黄斑症に関連していた. その発症において、血管透過性、血管新生、炎症を促進するVEGFが増加し、VEGFと拮抗的に働くPEDFが減少することが、重要な病因と考えられつつある<sup>13)</sup>. われわれの成績はその仮説に合致するものである.

## 2. 加齢黄斑変性症とCFH遺伝子多型との関連<sup>14)</sup>

4つのCFH遺伝子多型(rs800292, rs1061170, rs2274700, rs1410996)の中で、エクソン2の非同義置換rs800292, エクソン10の同義置換rs2274700, およびイントロン14のrs1410996が加齢黄斑変性症と有意に関連していた(それぞれ,  $p = 0.000009$ ,  $p = 0.00004$ ,  $p = 0.00002$ ). 一方、エクソン9の非同義置換rs1061170(Y402H)は有意に関連していなかった.

**Table 1.** Multivariate logistic regression analysis for the association with diabetic retinopathy

Variable	OR (95% CI)	<i>p</i> value
Female sex	0.82 (0.52-1.30)	NS
Age at onset	1.01 (0.99-1.03)	NS
Duration of disease	1.11 (1.07-1.15)	$2.56 \times 10^{-9}$
Systolic blood pressure	1.01 (1.00-1.03)	0.0359
HbA <sub>1c</sub>	1.01 (0.91-1.14)	NS
Cholesterol	1.00 (1.00-1.01)	NS
Insulin therapy	2.68 (1.60-4.48)	0.0002
<i>PEDF</i> C-5740T (rs12150053)*	2.40 (1.48-3.91)	0.0004

\* Dominant model (TC or CC vs TT). OR, odds ratio; NS, not significant.

**Table 2.** Interaction between VEGF C-634G (rs2010963) and PEDF C-5740T (rs12150053) in the association with diabetic retinopathy

SNP	DR (-) (n=229)	DR (+) (n=187)	OR (95% CI)*	<i>p</i> value
<i>VEGF</i> rs2010963 (CC vs CG or GG)	15.7% (36)	21.9% (41)	1.94 (1.09-3.46)	0.0239
<i>PEDF</i> rs12150053 (TC or CC vs TT)	27.1% (62)	39.6% (74)	2.40 (1.48-3.91)	0.0004
<i>VEGF</i> rs2010963 + <i>PEDF</i> rs12150053 (CC/TC or CC/CC vs others)**	3.9% (9)	13.9% (26)	7.06 (2.70-18.50)	$6.95 \times 10^{-5}$

\* Odds ratios were adjusted by multivariate logistic regression analysis including sex, age at onset, duration, systolic blood pressure, HbA<sub>1c</sub>, cholesterol, and insulin therapy.

\*\* Interaction between *VEGF* and *PEDF* SNPs is significant by multivariate logistic regression analysis ( $p = 0.0158$ ).

日本人においてもCFH遺伝子多型が加齢黄斑変性症と明確に関連することを、初めて示すことができた.

## 3. 加齢黄斑変性症とHTRA1遺伝子多型との関連<sup>15)</sup>

HTRA1遺伝子プロモーター領域の多型rs11200638が加齢黄斑変性症と有意に関連していた( $p = 0.000008$ ). さらに、病型別の解析では滲出型との関連が強く認められた. 日本人においても、HTRA1遺伝子多型は加齢黄斑変性症感受性遺伝子であることを確認した.

## 文 献

- 1) Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. 2002;Diabetes 51:1635-9.
- 2) Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Inukai K, Inoue I, Kawasaki I, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. Biochem Biophys Res Commun 2005;333:679-85.
- 3) Awata T, Neda T, Iizuka H, Kurihara S, Ohkubo T, Takata N, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Sawa T, Inukai K, Inoue I, Shibuya M, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. Diabetes Care 2004;27:2184-90.
- 4) Tombran-Tink J. The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights into phylogeny, function, and signaling. Front Biosci 2005;10:2131-49.
- 5) Liu H, Ren JG, Cooper WL, Hawkins CE, Cowan MR, Tong PY. Identification of the antivasopermeability effect of pigment epithelium-derived factor and its active site. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:6605-10.

- 6) Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Shao C, Mott R, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *Faseb J* 2006;20:323-5.
- 7) Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:385-9.
- 8) Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Nouredine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:419-21.
- 9) Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:421-4.
- 10) Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, Tam PO, Chan WM, Lam DS, Snyder M, Barnstable C, Pang CP, Hoh J. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 2006;314:989-92.
- 11) Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, Chen H, Zhao Y, Pearson E, Li X, Chien J, Dewan A, Harmon J, Bernstein PS, Shridhar V, Zabriskie NA, Hoh J, Howes K, Zhang K. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 2006;314:992-3.
- 12) Iizuka H, Awata T, Osaki M, Neda T, Kurihara S, Inoue K, Inukai K, Kabasawa S, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Promoter polymorphisms of the pigment epithelium-derived factor gene are associated with diabetic retinopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:421-6.
- 13) Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2004;350:48-58.
- 14) Mori K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Kawasaki I, Oosaki M, Iizuka H, Katayama S, Awata T, Yoneya S. Coding and noncoding variants in the CFH gene and cigarette smoking influence the risk of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:5315-9.
- 15) 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;52:636-41.

#### 研究成果リスト

- Iizuka H, Awata T, Osaki M, Neda T, Kurihara S, Inoue K, Inukai K, Kabasawa S, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Promoter polymorphisms of the pigment epithelium-derived factor gene are associated with diabetic retinopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(2):421-6.
- Mori K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Kawasaki I, Oosaki M, Iizuka H, Katayama S, Awata T, Yoneya S. Coding and noncoding variants in the CFH gene and cigarette smoking influence the risk of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:5315-9.
- 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;52:636-41.
- Miyazawa H, Kato M, Awata T, Kohda M, Iwasa H, Koyama N, Tanaka T, Huqun, Kyo S, Okazaki Y, Hagiwara K. Homozygosity haplotype allows a genomewide search for the autosomal segments shared among patients. *Am J Hum Genet* 2007;80(6):1090-102.