

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20592042
 研究課題名（和文） 狭義加齢黄斑変性症とポリープ状脈絡膜血管症におけるブルッフ膜構成分子遺伝子多型
 研究課題名（英文） Genetic variants of the Bruch's membrane component molecules in typical age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy
 研究代表者
 本田 茂（HONDA SHIGERU）
 神戸大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：60283892

研究成果の概要（和文）：日本人の加齢黄斑変性（AMD）の感受性遺伝子に関する研究を行い、ARMS2/HTRA1、CFH、CFI、RDBP、SKIV2L、CD36などの遺伝子多型と狭義AMDあるいはポリープ状脈絡膜血管症（PCV）との間の関連性を証明した。また、エラスチン遺伝子多型においては狭義AMDとPCV間で関連性が異なることを発見した。さらに、光線力学療法（PDT）の治療効果とAMDの表現型や遺伝子多型との関連を調べ、PDTの効果とAMDの病型やARMS2/HTRA1、CFHの遺伝子多型間に有意な関連性があることを証明した。

研究成果の概要（英文）：We found the positive associations of ARMS2/HTRA1, CFH, CFI, RDBP, SKIV2L and CD36 variants with typical age-related macular degeneration (tAMD) and polypoidal choroidal vasculopathy (PCV) in a Japanese population. We found that elastin gene polymorphism was differently associated between tAMD and PCV. ARMS2/HTRA1 and CFH variants were significantly associated with the outcome of photodynamic therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性、ポリープ状脈絡膜血管症、遺伝子多型、光線力学療法

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症（AMD）は先進国における中途失明原因の代表疾患であるが、わが国においては滲出型の症例が多く、視力予後は不良である。滲出型AMDは現在さらに狭義AMD、ポリープ状脈絡膜血管症（PCV）、網膜血管腫様増殖（RAP）の3型に分類されているが、科学的根拠に乏しい。これを解明するには疾患の遺伝子レベルでの解析が有用である。

AMDの疾患感受性に関してApoE、Fibulin、Compliment factor H（CFH）、HTRA1の遺伝子変異や多型との関連が報告されているが、これらの遺伝子型には人種差があることも知られており、AMDの普遍的な危険因子として定着するかどうかはさらに検討の必要があった。例えばCompliment factor HとApoE遺伝子の多型は白人AMDとの相関を認めたものの、日本人においては有意な相関性を認め

なかった。それに対して HTRA1 の遺伝子多型は日本人を含むアジア人および白人の AMD と高い相関を持つことが複数報告されていた。我々が日本人における HTRA1 の遺伝子多型を狭義 AMD と PCV で検討したところ、両群ともに対照群との間に強い有意差を認め、HTRA1 遺伝子多型と各疾患の高い相関が証明されたが、AMD 群と PCV 群間では明らかな差を認めなかった。ただし、当該遺伝子多型の各疾患に対する寄与度を表す寄与危険度

(population attributable risk: PAR) は PCV (44~61%) に比べて AMD (73~79%) では明らかに高値を示したことから両疾患の遺伝子的背景は必ずしも同一でないことが示唆された。HTRA1 はセリンプロテアーゼの一種でブッフ膜の構造などに関与している可能性があるが、AMD の病態における働きはまだ不明である。一方で AMD 眼におけるブッフ膜の弾性線維層の断裂や菲薄化が組織学的に証明され、ブッフ膜の構造や強度に影響を与え得る分子の解析は AMD の発生機序の解明に繋がるだけでなく、各病型の差異を証明する手掛かりになるものと思われた。

2. 研究の目的

本研究は検眼鏡および蛍光眼底造影検査において狭義 AMD、PCV、RAP と診断された症例においてエラスチンをはじめとするブッフ膜構成分子の遺伝子多型を検索し、臨床像との一致が得られるかを確認することを目的とする。特に臨床的疾患分類が遺伝子型の違いと一致するかどうかに着眼点を置き、ハプロタイプ解析によって各臨床病型に特徴的な遺伝子型の組み合わせが見つかるかどうかを調べる。さらに、遺伝子型が光線力学療法 (PDT) などの治療効果に反映されるかを確かめる。また、対象とする分子の遺伝子多型がエクソンやプロモーター領域に認められた場合、実際に同遺伝子がコードする蛋白の量あるいは質にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

1. 疾患分類と検体採取および遺伝子抽出
 - ①最終的に狭義 AMD 139 例、PCV 210 例、RAP 20 例、対照 200 例の検体を使用した。
 - ② 臨床経過から上記症例のうち PDT、経瞳孔温熱療法、抗 VEGF 療法などの治療を受けた (将来的に受ける) ものに関しては治療効果に関するデータも同時に収集し、治療に対する反応性を記録した。
2. 一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) 解析
 - ① ブッフ膜を構成する分子および加齢によってブッフ膜に蓄積する分子の内、候補となる分子 (補体 H 因子、補体 B 因子、ARMS2/HTRA1、CD36、エラスチン、PEDF、SOD

など) の遺伝子における tag SNP のタイピングを TaqMan® リアルタイム PCR 法にて決定し、複数の SNP 間のハプロタイプ (各アレルの組み合わせ) と各疾患 (狭義 AMD、PCV など) の疾患感受性の相関を解析した。

② PDT、抗 VEGF 療法などの治療を施した症例に対しては、遺伝子型の分類に従って治療効果の判定を行った。

4. 研究成果

1. 補体 H 因子 (Complement factor H: CFH) 遺伝子多型の内、Y402H 多型と呼ばれるものは白人 AMD との強い相関を認めるが、アジア人においてはマイナーアレルの頻度 (約 5%) が白人のそれ (約 38%) に比して非常に低いため日本人 AMD との関連を証明することは困難であったが、多数例のメタ解析で関連性を証明することができた。一方で、日本人に特に多い PCV に病型を絞って CFH 遺伝子領域を網羅的に検索した結果では、I62V 多型に最も強い相関を認めた。
2. ブッフ膜や脈絡膜血管の強度に関わると思われるエラスチンのイントロン遺伝子多型において狭義 AMD と PCV 間で関連性が有意に異なることを世界で初めて発表した。
3. 黄斑に多く存在し、酸化 LDL など脂質酸化に関与する CD36 のイントロン遺伝子多型と狭義 AMD の関連を世界に先駆けて発表した。これは最近になって、他のグループによって酸化 LDL を通した CD36 の AMD への関与が報告されている (Picard E et al. Aging (Albany NY). 2010;2:981-9)。
4. AMD に対して保護的に働くと考えられている C2-CFB 領域における多型を PCV について検索し、その結果 PCV においては C2-CFB よりも下流にある RDBP-SKIV2L 領域に関連が強いことを発見した。
5. その他にも CFI、SOD、PEDF などの遺伝子多型と狭義 AMD や PCV 間の関連性の有無を研究、発表した。
6. さらに PDT の効果と AMD の表現型や遺伝子多型間の関連を調べた結果、PDT の効果と AMD 病型や ARMS2、CFH の遺伝子多型間に有意な関連性があることを証明した。

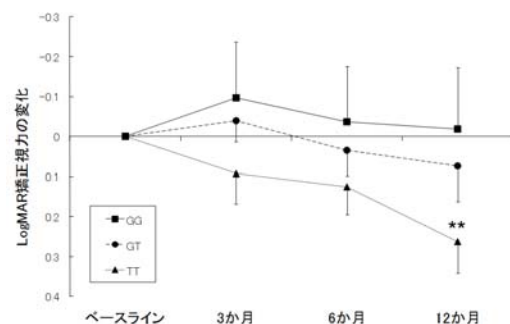


図1 狭義 AMD における A69S 多型と PDT 後視力変化の関連 (遺伝子型; 実線 GG, 破線

GT, 点線 TT) ** p<0.01

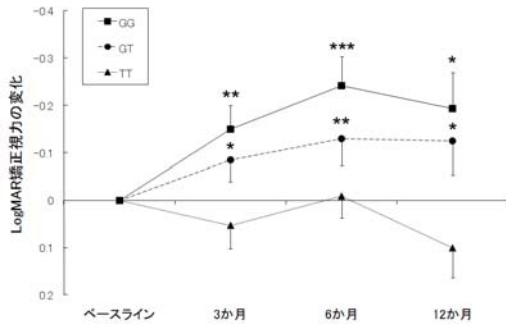


図2 PCVにおけるA69S多型とPDT後視力変化の関連 (遺伝子型; 実線 GG, 破線 GT, 点線 TT) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

ARMS2 遺伝子の rs10490924 (A69S) 多型は PCV の初診時 GLD と有意な相関が認められた (p=0.0025) が、狭義 AMD の初診時 GLD との相関は有意でなかった。また、同多型は狭義 AMD と PCV の初診時矯正視力との相関は認めなかった。一方、同多型は狭義 AMD と PCV における PDT12 ヶ月後の矯正視力と有意な相関を認めた [図 1, 2]。rs10490924 多型と術前の臨床的パラメータを説明変数に用いた重回帰分析では同多型が PDT 後 12 ヶ月視力の予測に有用である事が示された [表 1]。

採用された説明変数	標準回帰係数	標準誤差	P 値
ARMS2 rs10490924 における T アレルの数	0.18	0.041	0.0057
GLD	0.13	0.00	0.040
病型 (tAMD=0, PCV=1)	-0.23	0.061	0.0003
治療前矯正視力 logMAR	-0.45	0.079	<0.0001

表1 ARMS2 遺伝子多型および術前の臨床的パラメータと PDT 後 12 ヶ月視力(logMAR) との重回帰分析 (相関係数 |R|=0.55)

また、PCV 群において CFH 遺伝子の rs1061170 (Y402H) 多型と rs1410996 多型は初診時矯正視力や GLD との相関は認めなかったものの、PDT 後における病巣の解剖学的な改善との相関があった [表 2]。特に CFH Y402H 多型では疾患に対するリスクアレルが PDT の効果に対してはプラスに働くことが明らかになった。さらに rs1410996 多型は PDT12 ヶ月後の矯正視力とも有意な相関を認めた (p=0.0036)。

SNP ID	局在	メジャー/マイナーアレル	マイナーアレル頻度		相関結果		
			改善群	非改善群	アレルオッズ比 (95%CI)	P 値	補正 P 値
rs800292	Exon 2 (I62V)	G/A	0.22	0.29	1.47 (0.71-3.03)	0.3	0.34
rs1061170	Exon 9 (Y402H)	T/C	0.13	0.02	0.13 (0.09-0.63)	0.026	0.026
rs1410996	Intron 14	C/T	0.25	0.42	2.17 (1.10-4.17)	0.024	0.032

表2 CFH 遺伝子多型と PDT 後 12 ヶ月の解剖

学的改善との関連

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Matsumiya W, Honda S, Bessho H, et al. Early responses to intravitreal ranibizumab in typical neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. J Ophthalmol. in press

2. Bessho H, Honda S, Kondo N, Negi A. The association of ARMS2 polymorphisms with phenotype in typical neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. Mol Vis. 17:977-982, 2011.

3. Bessho H, Honda S, Kondo N, et al. Positive association of complement factor H gene variants with the effect of photodynamic therapy in polypoidal choroidal vasculopathy. J Clin Exp Ophthalmol. 2:122, 2011.

4. Bessho H, Honda S, Imai H, Negi A. Natural course and fundusoscopic findings of polypoidal choroidal vasculopathy in a Japanese population over one year of follow-up. Retina: 2011 Apr 7. [Epub ahead of print].

5. Kondo N, Bessho H, Honda S, Negi A. Complement Factor H Y402H Variant and Risk of Age-Related Macular Degeneration in Asians: A Systematic Review and Meta-Analysis. Ophthalmology. 118: 339-44, 2011.

6. Kondo N, Bessho H, Honda S, Negi A. Additional evidence to support the role of a common variant near the complement factor I gene in susceptibility to age-related macular degeneration. Eur J Hum Genet. 18:634-5, 2010.

7. Kondo N, Honda S, Kuno S, Negi A. Positive association of common variants in CD36 with neovascular age-related macular degeneration. Aging (Albany NY). 1:266-74, 2009.

8. Kondo N, Honda S, Kuno S, Negi A. Coding variant I62V in the complement factor H

gene is strongly associated with polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmology*. 116:304-10, 2009.

9. Honda S, Kurimoto Y, Kagotani Y, et al. Photodynamic therapy for typical age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy: a 30-month multicenter study in Hyogo, Japan. *Jpn J Ophthalmol*. 53:593-7, 2009.

10. Honda S, Imai H, Yamashiro K, et al. Comparative assessment of photodynamic therapy for typical age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy: a multicenter study in Hyogo prefecture, Japan. *Ophthalmologica*. 223:333-8, 2009.

11. Kondo N, Bessho H, Honda S, Negi A. SOD2 gene polymorphisms in neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Mol Vis*. 15:1819-26, 2009.

12. Kondo N, Honda S, Kuno S, Negi A. Role of RDBP and SKIV2L variants in the major histocompatibility complex class III region in polypoidal choroidal vasculopathy etiology. *Ophthalmology*. 116:1502-9, 2009.

13. Bessho H, Kondo N, Honda S, et al. Coding variant Met72Thr in the PEDF gene and risk of neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Mol Vis*. 15:1107-14, 2009.

14. Kondo N, Honda S, Ishibashi K, et al. Elastin gene polymorphisms in neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49:1101-5, 2008.

[学会発表] (計4件)

1. Honda S: Genetic characteristics of Polypoidal Choroidal Vasculopathy (PCV) in Japanese population. *Macula of Paris, Paris*, 2010.

2. 本田茂 他: 近未来の加齢黄斑変性治療を理解するために必要なゲノム学概説 加齢黄斑変性と遺伝子多型. 第64回日本臨床眼科学会, 神戸, 2010.

3. Honda S, et al: Positive association of

compliment factor H polymorphism with the effect of photodynamic therapy in polypoidal choroidal vasculopathy. *AAO, San Francisco*, 2008.

4. 本田茂 他: ポリプ状脈絡膜血管症の自然経過に対する統計学的検討および光線力学的療法の影響. 第62回臨床眼科学会, 東京, 2008.

[図書] (計7件)

1. 本田茂 硝子体の液化はどうして起こるのか? 眼のサイエンス 視覚の不思議 文光堂 2010、168-69.

2. 本田茂 光線力学的療法 六訂版家庭医学大全科 2010、

3. 本田茂 特集: 加齢黄斑変性治療の展開〜光線力学的療法〜 *NANO OPHTHALMOLOGY* 37巻 2009、9-12

4. 本田茂 トリアムシノロンの投与方法と注意点、眼科プラクティス 23巻 2008、326-327

5. 本田茂 光感受性物質の投与方法と注意点、眼科プラクティス 23巻 2008、330-331

6. 本田茂 徹底解説! 網膜剥離 眼科ケア 10巻 2008、22-26

7. 本田茂 加齢黄斑変性症 遺伝子多型 臨床眼科 62巻増刊号 2008、212-216

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 茂 (HONDA SHIGERU)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 60283892

(2) 研究分担者

石橋 一樹 (ISHIBASHI KAZUKI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20324923

(3) 連携研究者