

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890007

研究課題名（和文）加齢黄斑変性関連遺伝子 ARMS2 の機能および疾患発症機序の解明

研究課題名（英文）Functional dissection of ARMS2 protein, strongly associated with susceptibility to age-related macular degeneration.

研究代表者

神田 敦宏 (KANDA ATSUHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：80342707

研究成果の概要（和文）：ARMS2 (Age-Related Maculopathy Susceptibility 2) 遺伝子上の遺伝子多型が加齢黄斑変性 (Age-related Macular Degeneration, AMD) の発症に深く関与することが報告されているが、ARMS2 タンパク質の詳細な生物学的役割が明らかにされていない。本研究では、ARMS2 タンパク質の共役タンパク質などの同定などを試み、その機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：We and others previously demonstrated that SNP rs10490924 within the ARMS2 gene at 10q26 is strongly associated with susceptibility to age-related macular degeneration. The goal of this study is to gain additional insights into the function of ARMS2 and its association with AMD. We identified several ARMS2 interaction proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：加齢黄斑変性、LOC387715、ARMS2

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (Age-related Macular Degeneration, AMD) は、加齢を含む複数の要因により眼の網膜にある黄斑部が変性を起こす加齢神経変性疾患の一つで、世界中では5千万人以上が罹患している。アメリカでは途中失明の原因第一位となり、日本においては4位であるがその罹患者数は年々増加している。AMDでは網膜の中心部（視覚の最も鋭敏な部分である黄斑）が傷害され、物が歪んで見え、視力低下、そして最終的には失明する。初期

兆候は、網膜色素上皮細胞とブルッフ膜間に老廃物が凝集・沈着して出来るドルーゼンの形成と色素沈着過剰もしくは低下が起こる。後期には、脈絡膜新生血管の形成、光受容体と網膜色素上皮の萎縮が認められる。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萎縮型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型AMDの病型が主流である。しかしながら、未だAMDの発症の原因・メカニズムもわかっておらず、加齢、遺伝的素因 (polymorphism)、

環境因子（喫煙、食事）などが主要危険因子として上げられている。

これまでに数多くの遺伝学研究により、染色体 1q31 と 10q26 上の遺伝子多型が遺伝的危険因子として強く関連していることが立証されている。染色体 1q31 は、複数グループにより Complement factor H 遺伝子上での一塩基多型 (SNP, single nucleotide polymorphism) の Y402H が初の AMD 関連対立遺伝子として同定された。さらなる遺伝学研究の結果、染色体 10q26 上の新規遺伝子 ARMS2 (age-related maculopathy susceptibility 2) の Exon1 上に位置する SNP rs10490924 が主要な AMD 関連遺伝的要因であることを申請者は報告した [Kanda et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007]。SNP rs10490924 は ARMS2 タンパク質の 69 番目のアミノ酸であるアラニンをセリン (A69S) に置換する。

ARMS2 遺伝子は霊長類特異的に存在し、AMD で傷害される黄斑も同様に霊長類にのみ存在する。ARMS2 遺伝子は、2 つの Exon から構成されており 107 個のアミノ酸をコードしているが、その他のタンパク質との相同性やドメイン・モチーフなどはなく、その生理機能も明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、ARMS2 タンパク質の詳細な機能解析する。そして、SNP rs10490924 による ARMS2 タンパク質の 69 番目のアラニンがセリンへのアミノ酸置換による機能への影響を明らかにし、AMD 発症の機序を見出す。

3. 研究の方法

ARMS2 タンパク質の詳細な機能を解明すべく、複数の方法により ARMS2 共役タンパク質の検討・同定を行い、組換え ARMS2 タンパク質を作製し、構造解析などを行う。さらに ARMS2 遺伝子のノックダウンによる細胞内変化や A69S 置換による影響を検討するため ARMS2 に対する shRNA 安定発現細胞株を構築する。

4. 研究成果

ARMS2 の機能を解明するため、ARMS2 共役タンパク質を同定する。GST プルダウンアッセイ、ヒト網膜 cDNA ライブラリーを用いた Yeast two hybrid 法を行った。6 種類のクローンをスクリーニングで得ることに成

功し、そのうち 4 種類に関しては、培養細胞を用いた系で、ARMS2 との共役を確認した。今後、これらクローンを基に ARMS2 の詳細な機能解析を行う予定にしている。

ARMS2 はレアコドンも多く含んでいるため、大腸菌での組換えタンパクを作製することは困難である。そこで、全てのレアコドンにサイレント変異を加え、発現条件を検討することにより、効率よく組換え ARMS2 タンパクを発現・精製することが可能になった。

SNP rs10490924 は ARMS2 タンパク質の 69 番目のアミノ酸であるアラニンをセリン (A69S) に置換し、in silico 解析上では高次構造を変えることが予測された。そこで、組換え ARMS2 タンパク質を用い、野生型と A69S で違いがないかを円二色性法 (Circular Dichroism) を用いて解析した。しかしながら、A69S と野生型で大きな違いは認められなかった。

ARMS2 の細胞内における詳細な機能を解明するために、shRNA を複数作製し、安定して ARMS2 発現をノックダウンしている細胞株の構築を試みている。

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 10 件)

- ① Satofuka S, Kanda A, Ishida S. Receptor-associated prorenin system in the pathogenesis of retinal diseases. *Front Biosci*. In press 査読有
[doi:10.2741/345](https://doi.org/10.2741/345)
- ② Horie Y, Meguro A, Kitaichi N, Lee E B, Kanda A, Noda K, Song Y W, Park K S, Namba K, Ota M, Inoko H, Mizuki N, Ishida S, Ohno S. Replication of a microsatellite genome-wide association study of Behcet disease in a Korean population. *Rheumatology*. In press 査読有
[doi: 10.1093/rheumatology/ker444](https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker444)
- ③ Dong Z, Kase S, Ando R, Fukuhara J, Saito W, Kanda A, Murata M, Noda K, Ishida S. AlphaB-crystallin expression in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. *Retina*. In press 査読有
[doi: 10.1097/IAE.0b013e318233ab9c](https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e318233ab9c)

- ④ Fukuhara J, Kase S, Noda K, **Kanda A**, Murata M, Noda M, Ando R, Dong Z, Ishida S. Immunolocalization of vascular adhesion protein-1 in human conjunctival tumors. *Ophthalmic Res.* 48: 33-37, 2012 査読有 [doi: 10.1159/000335983](https://doi.org/10.1159/000335983)
- ⑤ Santon CM, Yates J, den Hollander A, Seddon J, Swaroop A, Stambolian D, Fauser S, Hoyng C, **Kanda A**, Branham K, Othman M, Chen W, Kortvely E, Chalmers K, Hayward C, Moore A, Dhillon B, Ueffing M & Wright A. Complement factor D in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 8828-8834 2011 査読有 [doi: 10.1167/iovs.11-7933](https://doi.org/10.1167/iovs.11-7933)
- ⑥ McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U, Dasari S, Klaver CC, Vingerling JR, Ho L, de Jong PT, Fletcher AE, Young IS, Seland JH, Rahu M, Soubrane G, Tomazzoli L, Topouzis F, Vioque J, Hingorani AD, Sofat R, Dean M, Sawitzke J, Seddon JM, Peter I, Webster AR, Moore AT, Yates JR, Cipriani V, Fritsche LG, Weber BH, Keilhauer CN, Lotery AJ, Ennis S, Klein ML, Francis PJ, Stambolian D, Orlin A, Gorin MB, Weeks DE, Kuo CL, Swaroop A, Othman M, **Kanda A**, Chen W, Abecasis GR, Wright AF, Hayward C, Baird PN, Guymer RH, Attia J, Thakkinstian A & Silvestri G. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration - a pooled analysis of 15 studies. *Hum Mutat.* 32: 1407-1416, 2011 査読有 [doi: 10.1002/humu.21577](https://doi.org/10.1002/humu.21577)
- ⑦ McKay GJ, Silvestri G, Chakravarthy U, Dasari S, Fritsche LG, Weber BH, Keilhauer CN, Klein ML, Francis PJ, Klaver CC, Vingerling JR, Ho L, De Jong PT, Dean M, Sawitzke J, Baird PN, Guymer RH, Stambolian D, Orlin A, Seddon JM, Peter I, Wright AF, Hayward C, Lotery AJ, Ennis S, Gorin MB, Weeks DE, Kuo CL, Hingorani AD, Sofat R, Cipriani V, Swaroop A, Othman M, **Kanda A**, Chen W, Abecasis GR, Yates JR, Webster AR, Moore AT, Seland JH, Rahu M, Soubrane G, Tomazzoli L, Topouzis F, Vioque J, Young IS, Fletcher AE & Patterson CC. Variations in Apolipoprotein E frequency with age in a pooled analysis of a large group of older people. *Am J Epidemiol.* 173:1357-1364, 2011 査読有 [doi: 10.1093/aje/kwr015](https://doi.org/10.1093/aje/kwr015)
- ⑧ Ando A, Kase S, Ohashi T, Doug Z, Fukuhara J, **Kanda A**, Murata M, Noda K & Ishida S. Tissue factor expression in human pterygium. *Mol. Vis.* 17:63-69, 2011 査読有 <http://www.molvis.org/molvis/v17/a9/>
- ⑨ **Kanda A**, Stambolian D, Chen W, Curcio CA, Abecasis GR and Swaroop A. Age-related macular degeneration-associated variants at chromosome 10q26 do not significantly alter ARMS2 and HTRA1 transcript levels in human retina. *Mol Vis.* 16:1317-1323, 2010 査読有 <http://www.molvis.org/molvis/v16/a145>
- ⑩ Chen W, Stambolian D, Edwards AO, Branham KE, Othman M, Jakobsdottir J, Tosakulwong N, Pericak-Vance MA, Campochiaro PA, Klein ML, Tan PL, Conley YP, **Kanda A**, Kopplin L, Li Y, Augustaitis KJ, Karoukis AJ, Scott WK, Agarwal A, Kovach JL, Schwartz SG, Postel EA, Brooks M, Baratz KH, Brown WL, Group CR, Brucker AJ, Orlinn A, Brown G, Ho A, Regillo C, Donoso L, Tian L, Kaderli B, Hadley D, Hagstrom SA, Peachey NS, Klein R, Klein BEK, Gotoh N, Yamashiro K, Ferris F, Fagerness JA, Reynolds R, Farrer LA, Kim IK, Miller JW, Cortón M, Carracedo A, Sanchez-Salorio M, Pugh EW, Doheny KF, Brion M, DeAngelis MM, Week DE, Zack D, Chew EY, Heckenlively JR, Yoshimura N, Iyengar SK, Francis PJ, Katsanis N, Seddon JM, Haines JL, Gorin MB, Abecasis GR, Swaroop A. Genetic variants near TIMP3 and HDL-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:7401-7406, 2010 査読有 [doi: 10.1073/pnas.0912702107](https://doi.org/10.1073/pnas.0912702107)

[学会発表] (計 11 件)

- ① **神田敦宏**ほか. 網膜疾患における(プロ)レニン受容体および関連分子の発現解析. 第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜)、2011/12/13-16
- ② **神田敦宏**. 糖尿病網膜症における(プロ)レニン受容体の血管新生活動性への関与. 第 4 回 Retina research meeting、東京大学医科学研究所 (東京)、2011/11/12
- ③ 野田航介、**神田敦宏**ほか. 糖尿病網膜症における白血球接着分子 VAP-1 と蛋白分解酵素 MMPs の接点. 第 1 回 わかもと先進眼科医療研究会、ロイヤルパークホテル (東京)、2011/7/29
- ④ Ando R, **Kanda A**, et al. Tissue factor expression in human pterygium. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting: Fort Lauderdale, USA; 2011/5/1-5
- ⑤ Dong Z, **Kanda A**, et al. AlphaB-crystallin in fibrovascular membrane of human proliferative diabetic retinopathy. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting: Fort Lauderdale, USA; 2011/5/1-5
- ⑥ Fukuhara J, **Kanda A**, et al. Vitreous levels of vascular adhesion protein-1 in proliferative diabetic retinopathy. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting: Fort Lauderdale, USA; 2011/5/1-5
- ⑦ **Kanda A**, et al. Combined genotyping and genome-wide expression analysis of peripheral blood to identify biomarkers for age-related macular degeneration. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting: Fort Lauderdale, USA; 2011/5/1-5
- ⑧ 安藤 亮、**神田敦宏**ほか. ヒト翼状片における Tissue Factor の発現. 第 115 回日本眼科学会、東京国際フォーラム (東京)、2011/5/12-15
- ⑨ 董 震宇、**神田敦宏**ほか. 増殖糖尿病網膜

症の線維血管膜における alphaB-crystallin の発現. 第 115 回日本眼科学会、東京国際フォーラム (東京)、2011/5/12-15

- ⑩ 福原淳一、**神田敦宏**ほか. 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液における VAP-1 濃度. 第 115 回日本眼科学会、東京国際フォーラム (東京)、2011/5/12-15
- ⑪ **神田敦宏**ほか. 染色体 10q26 番上の加齢黄斑変性関連 SNP と遺伝子解析. 第 15 回眼科分子生物学研究会、宮崎シーガイア (宮崎市)、2011/1/22-23

[図書] (計 1 件)

- ① 石田 晋、**神田敦宏**. 加齢と AMD. 特集「加齢黄斑変性 up to date」. Pharma Medica 28: 9-12, 2010

[その他]

ホームページ等

<http://eye.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 敦宏 (KANDA ATSUHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号 : 80342707

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :