

## 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 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：82643

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890258

研究課題名（和文） 加齢黄斑変性の感受性遺伝子の転写制御機構の解析

研究課題名（英文） Characterization of *HtrA1* Promoter in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration.

研究代表者

家島 大輔（IEJIMA DAISUKE）

国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター 分子細胞生物学研究部

研究者番号：10617137

研究成果の概要（和文）：加齢黄斑変性(AMD)は、先進国の成人の失明の主因であり、萎縮型(Dry-AMD)と、滲出型(Wet-AMD)に大別され、日本人では Wet-AMD が多い。しかし、この疾患の発症機序については未だ不明な点が多く、現時点では根本的な治療法がないのが現状である。このような背景を踏まえ、本研究は、日本人において特に問題となっている、Wet-AMD の発症機序を明らかにするため、Wet-AMD 患者の遺伝子変異を詳細に調べた。その結果、10番染色体上にある *ARMS2-HtrA1* にまたがる領域に、患者に相関性の高い変異部位が確認され、本研究では、この変異が Wet-AMD の発症に強く関わっていることを予想し、*ARMS2-HtrA1* に起因する Wet-AMD の発症機序の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of vision loss and blindness in the elderly. The dry form is more common and accounts for about 85–90% of AMD patients in US, while Japanese AMD patients predominantly progress to wet-form or polypoidal choroidal vasculopathy (PCV). Recent studies have shown *HtrA1*, a serine protease gene, as major risk factor for wet form AMD (DeWan et al., Science, 2006). Furthermore, we reported that Japanese typical wet form AMD patients show significant association with *ARMS2/HtrA1* (rs10490924:  $p=4.1 \times 10^{-14}$ , OR=4.16) (Goto, et al., JOBDI, 2009). The purpose of study is to characterize promoter function of *ARMS2 and HtrA1* genes in wet-form AMD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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 (AMD)、*ARMS2*、*HtrA1*、promoter

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は、遺伝的要因、環境的要因、習慣的要因により生じる多因子疾患であること考えられており、特に遺伝的要因に関してはこれまでに複数の研究が報告されている (Klaver CC, et al. (1998) Arch. Ophthalmol. 116:1646–1651., Klein BE, et al. (2001) Am. J. Epidemiol. 154:207–211., Meyers SM, et al. (1995) Am. J. Ophthalmol. 120:757–766, Hammond CJ, et al. (2002) Ophthalmology 109:730–736.)。

近年、アメリカ人の加齢黄斑変性患者を対象とした全ゲノム関連解析(genome wide association study: GWAS)によって 1 番染色体に存在する補体 H 因子(CFH)の遺伝子多型、特に、H 因子の Y402H が(rs1061170)が、この疾患と強く関連することが報告されている (Klein, RJ et al. (2005) Science 308: 385-389., Hageman, GS, et al. (2005) PNAS 103: 9649-9654.)。これまでの研究により、Y402H は欧米人などの白人では、疾患と強く関連しているものの、日本人や中国人などのアジア人では、Y402H の関連は観察されていない (Okamoto, H. et al. (2006) Mol. Vis. 12: 156-158., Gotoh, N. et al (2006) Hum. Genet. 120: 139-143.)。

一方で、最近、染色体 10 番における、*LOC387715/ARMS2(age-related maculopathy susceptibility 2)*と *HtrA1(HtrA serine peptidase 1)*遺伝子領域の遺伝子多形が、加齢黄斑変性と強く関連することが報告されている。我々は、これまでに、日本人の滲出型加齢黄斑変性患者 (Wet-AMD)を対象とした全ゲノム関連解析を行った結果、欧米人で強く関連した補体 H 因子の遺伝子多型は関連せず、*ARMS2-HtrA1* の遺伝子領域の

遺伝子多型が強く関連することを明らかにした(Goto, Akahori et al, JOBDI 2010)。これまでの解析により、全ゲノム関連解析によって、加齢黄斑変性において、染色体 10 番に強い相関が観察されており、この領域のタグ SNP である rs10490924 (*ARMS A69S*)が強く関連することが示されている。rs10490924 と連鎖不平衡を共有する領域は、*ARMS2* と *HtrA1* の 2 遺伝子にまたがっており、この 2 つの遺伝子のうち、どちらかの遺伝子（あるいは両方の遺伝子）が加齢黄斑変性のリスクを高めるのか、現時点では分かっていない。

## 2. 研究の目的

これまでの先行研究により、rs10490924 と連鎖不平衡を共有する領域は、*ARMS2* と *HtrA1* の領域にまたがっていることから、この領域における健常者と加齢黄斑変性患者のシーケンスを比較することにより、この 2 遺伝子における疾患特異的な変異を検出する。特に、この領域は、2 つの遺伝子の promoter をカバーする領域に該当することから、健常者と加齢黄斑変性患者において、これらの遺伝子の promoter 活性が異なることが予想される。本研究では、この 2 つの遺伝子の promoter 解析を行うことにより、健常者と加齢黄斑変性患者における *ARMS2-HtrA1* の promoter 活性の違いなどを検討し、さらには、EMSA 法や、LC-MASS Spectrometry などの手法を用いて、健常者と加齢黄斑変性患者における、この 2 つの遺伝子のプロモーターに結合する転写因子の比較を行い、疾患の要因となりうる転写因子の結合能の変化について検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) *ARMS2-HtrA1* 領域のシーケンス

研究を行う東京医療センターの倫理審査委員会による研究計画の承認ならびに、インフォームドコンセントにより患者に同意を得て、それぞれ約 200 名の白内障患者と AMD 患者の血液よりゲノムを採取し、シーケンサーを用いて、*ARMS2-HtrA1* 領域を含む約 10k base のシーケンスを行った。AMD を発症していない白内障患者由来のゲノムを正常ゲノム配列のコントロールとして、AMD 患者由来のゲノム配列と比較し、この領域における AMD 患者と相関性の高い変異部分の検出を行った。

#### (2) *ARMS2-HtrA1* promoter の解析

(1)の結果より、*ARMS2* ならびに *HtrA1* の promoter 領域に、AMD 患者に相関性の高い変異を検出したことから、この変異部分を含む promoter 領域を、ルシフェラーゼ遺伝子を含むベクターにクローニングし、これを、細胞株へ導入し、ルシフェラーゼアッセイを行い、この変異が入ることによる promoter 活性の変化を調べた。

#### (3) Promoter 結合分子の同定

Promoter 活性が予想される領域に対して、ビオチン標識した 2 本鎖 DNA Probe を作製し、このプローブを用いて、ゲルシフトアッセイ (EMSA) 法により、この領域に特異的に結合する分子を検出した。また、EMSA により検出した DNA 結合分子について、LC-MS による同定を試みた。

#### (4)AMD 患者からの iPS 細胞の作製

AMD 患者由来の iPS 細胞を得るため、インフォームドコンセントによる AMD 患者の同意

を得て、*ARMS2-HtrA1* が正常型の患者と、変異型の患者より採血を行い、血液中よりリンパ球を単離した。

単離したリンパ球に対して、センダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞の樹立に必要な、Oct3/4, c-Myc, Sox2, KLF4 を導入し、iPS 細胞を誘導した。

### 4. 研究成果

実験の結果、*HtrA1* 遺伝子のエクソン 1 上流において約 400base にわたって、患者に有意な大規模な欠損変異が見つかった。さらにこの変異部位を含む *HtrA1* のプロモーター領域をクローニングし、ARPE19 (網膜色素上皮細胞株)、RGC-5(網膜神経節細胞株)、661W (網膜視細胞株) に導入し、ルシフェラーゼアッセイを用いてプロモーター活性を調べた結果、RGC-5 と 661W において、この変異を有する遺伝子型で、正常型の配列よりもプロモーター活性が有意に亢進することが分かった。

さらに、コンピュータによる転写因子予測、Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)、質量分析などを用いてこの領域に結合する転写因子を解析した結果、この遺伝子変異により、*HtrA1* プロモーターに結合する転写因子が変化し、生体における *HtrA1* の発現が亢進することがわかった。また、iPS 細胞を用いて、生体内における *HtrA1* の発現量を、qRT-PCR を用いて比較した結果、変異型の配列を持つ患者由来の iPS 細胞で、有意に *HtrA1* の発現が上昇しており、生体内においても、この変異が *HtrA1* の発現上昇に寄与している可能性が示唆された。

これまで、動物モデルを用いた先行研究により、個体レベルで *HtrA1* を強制発現させると、脈絡膜から新生血管が誘導され Wet-AMD

類似の所見が観察されることが報告されており、生体において、*HtrA1* の発現が上昇することにより *Wet-AMD* の発症が惹起されることが予測されている。本研究の結果は、*HtrA1* プロモーター領域の変異により、内在的に *HtrA1* の発現上昇が生じることを示すものであり、AMD 患者で有意なこの変異が、*Wet-AMD* を引き起こす一因になることを示唆している。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Daisuke Iejima, Toru Noda, Atsushi Mizota, Takeshi Iwata,  
Characterization of HtrA1 Promoter in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration.,  
2013年05月05日～2013年05月09日,  
Seattle, Washington
- ② Mao Nakayama , Daisuke Iejima ,  
Masakazu Akahori, Takeshi Iwata,  
Overexpression of HtrA1 and Smoking Evokes Choroidal Neovascularization and Retinal Deposit in, Aged Mice, The Association for Research in Vision and Ophthalmology,(ARVO), 2013年05月05日～2013年05月09日,  
Seattle, Washington

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

家島 大輔 (IEJIMA DAISUKE)

国立病院機構 東京医療センター 分子細胞生物学研究部・研究員

研究者番号：10617137