

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 B
研究期間：2007～2008
課題番号：19390442
研究課題名（和文） ゲノム解析、幹細胞生物学を利用した日本人加齢黄斑変性の発症と進行機序の解明
研究課題名（英文） Investigation of the mechanism of age-related macular degeneration in Japanese patients through genomic analysis and stem cell biology
研究代表者 吉村 長久 (YOSHIMURA NAGAHISA)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：70211662

研究成果の概要：

日本人加齢黄斑変性患者の遺伝子解析、末梢血骨髄由来細胞の解析より、欧米との異同、疾患に特徴的な所見、新たな発症・進行に関する知見が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
20 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：ゲノム医学 加齢黄斑変性 骨髄幹細胞 疾患感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は失明原因の上位に位置する重篤な疾患であるが、その病態・治療についてはまだ十分に明らかにはされていない。また、欧米と日本ではその病態が異なることが知られているが、その違いの原因は全く明らかにされていない。治療がすべて欧米から輸入されたものであり、日本人の加齢黄斑変性には日本独自の対策の必要性も指摘されている。日本人加齢黄斑変性についての遺伝的背景はまだよく調べられていない。また、病態に影響を及ぼしていると考えられる骨髄由来細胞の役割についても不明である。

2. 研究の目的

日本人加齢黄斑変性の新疾患感受性因子候補を得、それを海外のデータと比較しその異同から発症メカニズムの考察を行う。既知の遺伝子多型の臨床的意義を解明し、新治療への知見とつなげる。加齢黄斑変性に関与する末梢血幹細胞の関与のメカニズムを解明し、それを応用した新治療を提示することを目標とする。

これまで解明が遅れてきた、遺伝的背景、環境因子を明らかにすることで、今後の加齢黄斑変性医療に重要な知見を得る。

3. 研究の方法

必要十分な臨床所見が得られた患者に対し

十分なインフォームドコンセントを行い、同意が得られた患者から末梢静脈血を採血する。採血はルーチンで行なっている血管造影検査時に行い、またゲノム解析、末梢血幹細胞解析用それぞれの採血も同時に行なうことで患者負担を最小とする。

検体は DNA 抽出用、細胞解析用と血清に分け、細胞解析は同日中に開始する。血清は冷凍保存とする。

Ficoll-Paque を用いて比重遠心法にて単核球分画を分離抽出する。単核球の一部を取り出し、CD34 抗体陽性造血幹細胞、血管前駆細胞、CD31, CD146 (VE-Cadherin), AC133) 数を FACS (京都大学医学部、探索医療センター、の各共有施設を利用する)にて計測する。これら細胞は通常状態では末梢血中にごく少数しか存在しないため、正確性を期し、キットを利用する。血管内皮コロニー形成因子、顆粒球・マクロファージコロニー形成因子を測定する。分離した単核球分画を 24 穴もしくは 96 穴プレートに分散し、内皮細胞分化条件もしくは顆粒球・マクロファージ細胞分化条件にて培養する。後者はメチルセルロースゲル内にて培養する。数日後、スフェアを形成し、増殖した分化細胞を CD34, CD31, CD133, CD146, KDR, CD56, など各分化細胞陽性抗体を用いて染色し、それぞれに分化した細胞であることを確認する。コロニー形成能はこれまでの報告に従い、培養数日後のコロニー数を計測する。細胞機能はコロニー形成能に加え、細胞の遊走能、および浸潤能も測定し、総合的に判断する。

ゲノム DNA を抽出する。これまでに解明されたまた今後解明されるであろう加齢黄斑変性に対する疾患感受性遺伝子の領域について、SNP discovery を行う。Hapmap, JSNP, dbSNP を用いたデータマイニングを活用し、また遺伝子によっては DNA のリシークエンシングも行う。Affymetrix 社の 500K Genechip (または 500KB Genechip) を用いて一次スクリーニングを続け、二次スクリーニングは Illumina 社のカスタムアレイを用いる。

4. 研究成果

加齢黄斑変性についてのゲノム解析では、これまで報告されている CFH 遺伝子や ARMS2 遺伝子の多型との相関が、ポリープ状網脈絡膜症や網膜血管腫状増殖 (RAP) においても同様に強くみられることを確認した。また光線力学療法後 2 年の経過と CFH 遺伝子・HTRA1 遺伝子多型との関連の有無も検討し報告した。

病的近視については、先行論文において報告された COL1A1 遺伝子や COL2A1 遺伝子多型と病的近視との関連が、我々の有する病的

近視日本人サンプルにおいては認められなかったことを報告した。

末梢血細胞解析では老化骨髄細胞と若年骨髄細胞の機能の違いを検討した。脈絡膜血管新生膜形成の状態を考慮し、細胞を血管新生刺激条件下培養し、その刺激による細胞の反応をサイトカイン分泌の変化で比較した。PCR アレイで発現を検討したところ、多くのサイトカインで変化が見られたが、特に PEDF (pigment epithelial derived factor) の発現が加齢骨髄由来細胞で低下していた。PEDF は血管抑制に働くとされている重要なサイトカインであり、これまでの加齢骨髄で脈絡膜血管新生膜形成の抑制能が低下していることを説明できる結果である。他にも因子があると考えられ現在検索中である。これらの結果は加齢黄斑変性の病態に関する新知見であり、今後の診療に取り入れるべくさらに検討を加えていく予定である。

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 27 件)

Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Otani A, Tsujikawa A, Yamashiro K, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. Absence of association between COL1A1 polymorphisms and high myopia in the Japanese population. Invest Ophthalmol Vis Sci. 544-550 2009

Sasahara M, Otani A, Oishi A, Kojima H, Yodoi Y, Kameda T, Nakamura H, Yoshimura N. Activation of bone marrow-derived microglia promotes photoreceptor survival in inherited retinal degeneration. Am J Pathol. 1693-1703 2008

Gotoh N, Yamada R, Nakanishi H, Saito M, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. Correlation between CFH Y402H and HTRA1 rs11200638 genotype to typical exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy phenotype in the Japanese population. Clin Experiment Ophthalmol 36:437-442, 2008

Sasahara M, Otani A, Oishi A, Kojima H, Yodoi Y, Kameda T, Nakamura H, Yoshimura N. Activation of Bone Marrow-Derived Microglia Promotes Photoreceptor Survival in Inherited Retinal Degeneration. Am J Pathol 172:1693-1703, 2008

Gotoh N, Yamada R, Matsuda F, Iida T, Yoshimura N. Manganese Superoxide dismutase gene (SOD2) polymorphism and exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. Am J Ophthalmol 146:146-147,

2008.

Oishi A, Otani A, Sasahara M, Kojima H, Nakamura H, Yodoi Y, Yoshimura N. Granulocyte colony stimulating factor protects retinal photoreceptor cells against light-induced damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 49:5629-5635, 2008.

[学会発表] (計 27 件)

ARVO 2008

Lysyl Oxidase-like 1 Polymorphisms and Exfoliation - Syndrome in the Japanese Population. Hayahshi H, Yoshimura N et al.

Association Between LOC387715/*HTRA1* and Japanese Exudative Age-Related Macular Degeneration. Gotoh N, Yoshimura N. et al.

A. Oishi, A. Otani, M. Sasahara, H. Kojima, Y. Yodoi, N. Yoshimura: Granulocyte Colony Stimulating Factor Protects Retinal Photoreceptor Cells Against the Light-Induced Damage.

第 47 回日本網膜硝子体学会総会・日本眼循環学会 合同学会：京都

加齢黄斑変性とポリープ状脈絡膜血管症における ARMS2 遺伝子領域の多型、後藤謙元 吉村長久 他

厚生労働省難治性疾患克服研究事業 網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班 班会議，福岡，2008.1.18-19

中西秀雄，後藤謙元、林寿子、大谷篤史、辻川明孝、田村寛、吉村長久、島田典明（東京医歯大）、大野京子（東京医歯代）、望月學（東京医歯大）、斎藤昌晃（福島医大）、斎藤国治（福島医大）、飯田知弘（福島医大）：日本人の病的近視における COL1A1 遺伝子多型の関与。

大谷篤史，鄒賀、佐々原学、淀井有子、大石明生、亀田隆範、小蔦洋史、吉村長久：血管新生の形態と骨髄細胞の関与。

後藤謙元，辻川明孝、中西秀雄、林寿子、大谷篤史、田村寛、吉村長久、斎藤昌晃（福島医大）、斎藤国治（福島医大）、飯田知弘（福島医大），滲出型加齢黄斑変性における遺伝子多型と光線力学療法 2 年後の成績。

第 112 回日本眼科学会総会，神奈川，2008.4.17-20

佐々原学、大谷篤史、大石明生、小蔦洋史、淀井有子、中村元、吉村長久：骨髄由来細胞と網膜色素変性。

大石明生、大谷篤史、佐々原学、小蔦洋史、淀井有子、吉村長久：G-CSF の網膜光障害における保護効果。

林寿子，後藤謙元、植田良樹（市立長浜）、中西秀雄、板谷正紀、吉村長久：日本人における LOXL 1 遺伝子多型と落屑症候群の相関

の検討

[図書] (計 1 件)

加齢黄斑変性 吉村長久 医学書院

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

骨髄由来幹細胞、前駆細胞機能賦活による網膜疾患治療 未公開特許

整理番号 1859

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 長久 (YOSHIMURA NAGAHISA)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70211662

(2) 研究分担者

辻川 明孝 (TSUJIKAWA AKITAKA)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40402846

大谷 篤史 (OTANI ATSUSHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30314222

田村 寛 (TAMURA HIROSHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40418760

(3) 連携研究者