

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592008

研究課題名（和文） 緑内障治療薬の反応性と標的タンパクの遺伝子多型との関連

研究課題名（英文） Association between response to antiglaucomatous drug and genetic polymorphisms of the target protein.

研究代表者

桜井 真由美（SAKURAI MAYUMI）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：50303269

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに、健常人を対象として、ラタノプロストによる眼圧下降作用と、その作用点であるプロスタグランジン FP レセプター遺伝子の 2 つの多型（rs3753380、rs3766355）の間に、関連性があることを報告した。そこで、緑内障や高眼圧症の患者において、同様の関連性が見られるかを検討したが、この 2 つの遺伝子多型と眼圧下降率の間に有意な関連は見出せなかった。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported the association between two polymorphisms (rs3753380、rs3766355) of the prostaglandin FP receptor gene and response to latanoprost in normal subjects. In this study, we examined whether the association was observed in glaucoma and ocular hypertension patients. However, the genotypes of these polymorphisms were not correlated with percent IOP (Intraocular Pressure) reduction by latanoprost.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：遺伝子、薬剤反応性、緑内障

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障の薬物治療には、プロスタグランジン関連薬、アドレナリンβ遮断薬、α1遮断薬、炭酸脱水酵素阻害薬などが用いられる。しかし実際に、これらの薬のうち1つを選択して患者に点眼した場合、期待したほどの効果が得られないことはまれではない。このため、作用機序の異なる薬剤を追加点眼したり、他の薬剤に切りかえたりするのが現状である。

近年のファルマコゲノミックスの発展により、種々の薬剤の効果や副作用が遺伝子によって規定されていることが明らかになってきた。また、薬剤の作用点となるレセプター遺伝子の多型と薬剤の反応性の関連性についても、降圧作用に対するアドレナリンβ1レセプター遺伝子の多型、気管支喘息患者における気管支拡張作用に対するアドレナリンβ2レセプター遺伝子の多型など、数多く報告

されている。

これに対し、眼科領域では近年、アドレナリンβ1レセプター遺伝子の多型、R389Gがベタキソロールによる眼圧下降作用と関連がある(Schwartz SG, et al. Ophthalmology, 112:2131-6, 2005)という報告があるのみであった。

## 2. 研究の目的

我々はプロスタグランジン関連薬であるラタノプロストにノンレスポnderがいることを報告した。また、ラタノプロストによる眼圧下降作用を規定する遺伝子多型があるかどうかを、健常人を用いて検討してきた。その結果、ラタノプロストの眼圧下降作用がラタノプロストの作用点であるプロスタグランジンFPレセプター遺伝子のプロモーター領域、イントロン1領域の多型(rs3753380とrs3766355)と関連することを見出した。また、この2つの多型がFPレセプターの遺伝子発現に関与しているかを調べるために、ホタルルシフェラーゼによるレポーターアッセイを行ったところ、rs3766355の多型により、FPレセプターの転写が低下することを明らかにした(Sakurai M, et al. Ophthalmology, 114:1039-45, 2007)。

そこでこの研究をさらに発展させるため、緑内障患者において、ラタノプロストによる眼圧下降作用が健常人と同様にFPレセプター遺伝子の多型と関連するかどうかを検討した。

## 3. 研究の方法

本研究は金沢大学倫理委員会の承認を得て行われ、インホームドコンセントにより同意を得られた患者を対象とした。緑内障が疑われ金沢大学附属病院を受診した患者で、Goldman圧平式眼圧計で測定した点眼前眼圧が2回以上あり、ラタノプロスト点眼を開始された患者を抽出した。点眼前眼圧は緑内障点眼薬をまだ点眼していないか、点眼していた場合は少なくとも4週間点眼中止後の測定値とした。NTG(86人)、狭義POAG(16人)、OH(3人)と診断された患者を対象とし、落屑緑内障、視神経乳頭低形成は除外した。眼圧が1日の複数時刻に測定された場合には、午前中(9時)の測定値を用いた。検討した眼は、原則として先にラタノプロスト点眼となった眼を選択し、左右同時点眼の場合には、視野の進行した眼の眼圧値を検討した。また、すでに反対眼にラタノプロストが点眼されており点眼前眼圧が得られない場合は後に点眼となった眼の眼圧値を検討した(2眼)。点眼前眼圧測定から、ラタノプロスト点眼後眼圧2回目を測定するまでの期間は、9ヶ月

以内とし、ラタノプロスト点眼期間は6ヶ月以内の値を用いた。点眼後眼圧は点眼開始後2週間以上経過した測定値のうち点眼期間の短い2回を用いた。手術歴のある眼(7眼)は、白内障4眼、網膜剥離2眼、網膜裂孔で光凝固1眼であり、いずれも手術後6ヶ月以上経過していたので対象に含めた。年齢はラタノプロスト点眼開始時の年齢とした。測定した眼圧値より眼圧下降率1(%ΔIOP1)を計算した。

$\% \Delta IOP1 = (\text{点眼前眼圧の平均} - \text{点眼後眼圧の平均}) / \text{点眼前眼圧の平均}$

%ΔIOP1が10%未満をLow responder、10%以上25%未満をMedium responder、25%以上をHigh responderとして評価した。

また、片眼のみにラタノプロストを点眼した対象62人に関しては、非点眼側の眼圧を対照とした眼圧下降率2(%ΔIOP2)を算出した。

$\% \Delta IOP2 = \{(\text{点眼側の点眼前眼圧の平均} - \text{点眼側の点眼後眼圧の平均}) - (\text{非点眼側の点眼前眼圧の平均} - \text{非点眼側の点眼後眼圧の平均})\} / \text{点眼側の点眼前眼圧の平均} \times 100$

被験者の末梢血より遺伝子DNAを抽出し、これを鋳型として、FPレセプター遺伝子の9カ所の多型(図1)に関して遺伝子型のタイピングを行った。タイピング法はいずれも多型を含む領域をPCRにより増幅し、rs3753380に関してはSingle Strand Conformation Polymorphism(SSCP法)で、A938G(K313R)に関してはEco81Iを用いたRestriction Fragment Length Polymorphism(RFLP法)で解析した。それ以外はダイレクトシーケンシングにより行った。

FPレセプター遺伝子多型と算出された眼圧下降率の間に関連があるかをSPSSとSNPAlyzeを用いて統計学的に解析した。

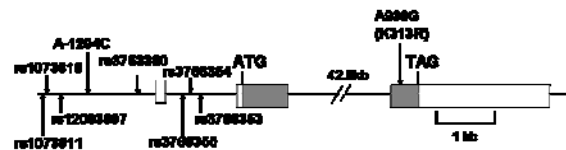


図1 プロスタグランジンFPレセプター遺伝子の多型

## 4. 研究成果

### A) 全対象の検討

研究に同意を得られた105人の被験者の平均年齢は54.0±15.2才(平均±標準偏差)、性別は男性60人、女性45人、対象眼は右眼50眼、左眼55眼であった。点眼前眼圧の平均は16.5±3.3 mmHg(11~32 mmHg)、ラタノプロスト点眼後平均眼圧は13.9±2.3 mmHg(10~21 mmHg)、平均眼圧下降率は14.5±13.0%(-21.4~44.4%)であった。

全ての多型はHardy-Weinbergの法則に従

っていた。各多型の遺伝子型と下降率を表 1 に示した。rs1073611 と rs1076310 の遺伝子型は完全に一致していた。また、遺伝子頻度は A-1294C 以外では、健常人を対象とした解析とほぼ変わらなかったが、rs3766355 では前回の健常人の解析では、A/A ホモの人数が多かったのに対し、今回は、C/C ホモの人数が多かったため、major な遺伝子が C の場合と、A の両方の場合について解析した。遺伝子型によって t 検定を行ったが、眼圧下降率 1 が有意に変化する多型は存在しなかった。

表1 多型の遺伝子型による眼圧下降率1

SNP ID	allele	major homo	minor carrier	P
rs1073611	A/G	14.9±1.3 (89)	12.5±4.3 (16)	0.602
rs1076310	G/A	14.9±1.3 (89)	12.5±4.3 (16)	0.602
rs12093097	C/T	14.7±1.3 (90)	13.5±4.5 (15)	0.811
A-1294C	A/C	15.1±1.5 (84)	12.3±2.2 (21)	0.393
rs3753380	C/T	14.7±1.9 (44)	14.4±1.7 (81)	0.896
rs3766355	C/A	14.7±2.8 (28)	14.5±1.4 (77)	0.947
	A/C	13.6±2.2 (21)	14.8±1.5 (84)	0.709
rs3766354	G/A	14.4±1.7 (65)	14.7±1.8 (40)	0.894
rs3766353	G/T	15.7±1.7 (59)	13.0±1.9 (46)	0.294
A938G	A/G	14.2±1.3 (100)	20.5±4.9 (5)	0.296

平均±標準誤差 (人数)  
P: Student t-test

また、眼圧下降率 1 によって、Low responder、Medium responder、High responder に分類すると、Low responder は 33 人、Medium responder は 47 人、High responder は 25 人であった。この分類と各多型の遺伝子型によって  $\chi^2$  検定または Fisher の正確確率検定を行ったところ、rs3766354 で Low responder とその他の群に分類した場合、G キャリアーと A/A ホモの間で Fisher の正確確率検定により、P 値は 0.0542 だった (表 2)。rs3753380、rs3766355、rs3766354、rs3766353 の多型には連鎖が見られたことから、何らかの関連性があるのかもしれない。

表2 rs3766354における遺伝子型分布

	G/G	G/A	A/A
Low	21	12	0
Med	28	14	7
High	18	6	1

B) 眼圧が 18 mmHg 以上を対象とした検討

今回の対象は、点眼前眼圧が低く眼圧下降率が、健常人を対象にした場合よりも低かった。そこで、点眼前眼圧が 18 mmHg 以上の対象、33 人に関して再度解析した。この対象では、NTG17 人、POAG13 人、OH3 人だった。平均点眼前眼圧は 20.3±2.9 mmHg、眼圧下降率 1 は 23.2±10.7% であった。各多型における眼圧下降率を表 3 に示した。rs1073611、rs1076310、rs12093097 の遺伝子型は完全に一致していた。その結果、A-1294C において、A/A ホモの眼圧下降率 1 は 25.5±2.3% (24 人) であるのに対し、C キャリアーでは 16.8±2.1 (9 人) と有意な差があった。この対象に関して、眼圧下降率 1 によって同様に、Low

表3 点眼前眼圧18mmHg以上における眼圧下降率1

SNP ID	allele	major homo	minor carrier	P
rs1073611	A/G	21.8±2.2 (26)	28.1±3.3 (7)	0.172
rs1076310	G/A	21.8±2.2 (26)	28.1±3.3 (7)	0.172
rs12093097	C/T	21.8±2.2 (26)	28.1±3.3 (7)	0.172
A-1294C	A/C	25.5±2.3 (24)	16.8±2.1 (9)	0.036
rs3753380	C/T	22.5±2.4 (15)	23.7±2.8 (18)	0.741
rs3766355	C/A	23.9±3.7 (10)	22.9±2.2 (23)	0.807
	A/C	16.9±2.3 (6)	24.6±2.2 (27)	0.116
rs3766354	G/A	23.1±2.4 (20)	23.3±3.1 (13)	0.966
rs3766353	G/T	23.5±2.3 (23)	22.3±3.2 (10)	0.772
A938G	A/G	22.7±2.0 (30)	28.2±1.9 (3)	0.406

平均±標準誤差 (人数)  
P: Student t-test

responder、Medium responder、High responder と分類すると、Low responder は 1 人、Medium responder は 18 人、High responder は 14 人であった。A-1294C において、High responder とその他の群で A/A ホモと C キャリアーで Fisher の正確確率検定を行うと、P=0.0466 と有意であった (表 4)。このことは、A/A ホモと C キャリアーで High responder になりやすさに差があることを示唆している。また、遺伝子による検定でも P=0.0184 と有意であった。

表4 A-1294Cにおける遺伝子型分布

	A/A	A/C	C/C
Low	1	0	0
Med	10	6	2
High	13	1	0

C) 非点眼側を対照とした検討

非点眼側を対照とした被験者は、62 人で点眼前眼圧は 16.7±3.3 mmHg、眼圧下降率 2 は 14.9±11.4% だった。各多型における眼圧下降率 2 を表 5 に示したが、有意な差はどの多型においても、認められなかった。

表5 多型の遺伝子型による眼圧下降率2

SNP ID	allele	major homo	minor carrier	P
rs1073611	A/G	14.4±1.6 (51)	17.3±2.9 (11)	0.436
rs1076310	G/A	14.4±1.6 (51)	17.3±2.9 (11)	0.436
rs12093097	C/T	14.2±1.6 (52)	18.4±3.0 (10)	0.293
A-1294C	A/C	15.4±1.7 (47)	13.2±2.8 (15)	0.505
rs3753380	C/T	15.5±1.8 (29)	14.4±2.2 (33)	0.695
rs3766355	C/A	12.8±2.3 (15)	15.6±1.8 (47)	0.423
	A/C	12.8±2.7 (12)	15.4±1.7 (50)	0.481
rs3766354	G/A	15.9±1.9 (38)	13.4±2.3 (24)	0.400
rs3766353	G/T	13.5±1.9 (33)	16.5±2.3 (29)	0.269
A938G	A/G	15.1±1.5 (61)	3.7 (1)	0.325

平均±標準誤差 (人数)  
P: Student t-test

今回の解析では、健常人で見られた rs3753380、rs3766355 の多型とラタノプロストによる眼圧下降作用には関連性は見られなかった。しかし、rs3766354 で傾向差が見られたこと、眼圧が 18mmHg 以上の対象において、A-1294C で有意差が見られたことから、FP レセプター遺伝子の多型がラタノプロストによる反応性に何らかの関与をしている可能性がある。今後は、さらに患者数を増やして解析を行う予定である。しかし、緑内障患者の眼圧は、健常人に比べ、変動が激しく

ラタノプロストの効果を評価するのが難しいことから、健常人で行ったように眼圧測定時刻を決め、他眼を対照とした prospective な研究法が必要であると考えられる。

#### 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 6 件)

1. Miyashita H, Tagawa S, Takeda H, Higashide T, Sugiyama K. Comparison between stereo angiographic findings and histopathologic findings in endotoxin-induced uveitis. *Curr Eye Res*. 2009 34(7):536-42. 査読有
2. Nagata A, Higashide T, Ohkubo S, Takeda H, Sugiyama K. In vivo quantitative evaluation of the rat retinal nerve fiber layer with optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 50(6):2809-15. 査読有
3. Yamamoto N, Takemori Y, Sakurai M, Sugiyama K, Sakurai H. Differential recognition of heat shock elements by members of the heat shock transcription factor family. *FEBS J*. 2009 276(7):1962-74. 査読有
4. Okuda T, Higashide T, Fukuhira Y, Sumi Y, Shimomura M, Sugiyama K. A thin honeycomb-patterned film as an adhesion barrier in an animal model of glaucoma filtration surgery. *J Glaucoma*. 2009 18(3):220-6. 査読有
5. Takahashi M, Higashide T, Sakurai M, Sugiyama K. Discrepancy of the intraocular pressure response between fellow eyes in one-eye trials versus bilateral treatment: verification with normal subjects. *J Glaucoma*. 2008 17(3):169-74. 査読有
6. Sakurai M, Higashide T, Takahashi M, Sugiyama K. Association between genetic polymorphisms of the prostaglandin F2alpha receptor gene and response to latanoprost. *Ophthalmology*. 2007 114(6):1039-45. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 若林祐佳、東出朋巳、桜井真由美、高延琳、杉山和久 緑内障患者における片眼トリアルでの眼圧回数と眼圧変動補正の影響、第 113 回日本眼科学会総会、2009 年 4 月 17 日、東京国際フォーラム (東京都)

2. 室谷英治、高延琳、桜井真由美、武田久、東出朋巳、樋田一徳、杉山和久  $\beta 1\beta 2$  アドレナリン受容体ダブルノックアウトマウスの眼圧日内変動、第 113 回日本眼科学会総会、2009 年 4 月 16 日、東京国際フォーラム (東京都)
3. 高延琳、桜井真由美、武田久、東出朋巳、川瀬和秀、杉山和久 無治療広義開放隅角緑内障患者の眼圧とアドレナリンレセプター遺伝子多型の関連、第 113 回日本眼科学会総会、2009 年 4 月 16 日、東京国際フォーラム (東京都)
4. 室谷英治、大久保真司、井尻茂之、桜井真由美、川口一朗、吉田都是、杉山和久、川野充弘、高木峰夫、田中恵子 ステロイド抵抗性の抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎に対する血漿交換療法、第 62 回臨床眼科学会、2008 年 10 月 26 日、東京国際フォーラム (東京都)
5. 室谷英治、大久保真司、東出朋巳、桜井真由美、杉山和久、高橋良一、池田篤平、岩佐和夫 Mitofusion2 の遺伝子変異を認めた遺伝性運動感覚ニューロパチー VI 型の一例、第 16 回日本神経眼科学会総会、2008 年 10 月 12 日、朱鷺メッセ (新潟県)
6. 室谷英治、東出朋巳、大久保真司、桜井真由美、杉山能子、白尾裕、杉山和久 中心暗点と視神経乳頭の耳側蒼白を呈する 5 歳児の 1 例、第 27 回金沢医科大学眼科研究会、2007 年 10 月 28 日、金沢市文化ホール (石川県)
7. 桜井真由美、川瀬和秀、高橋眞美、高延琳、東出朋巳、杉山和久、健常人における眼圧と  $\beta$ -アドレナリンレセプター遺伝子多型の解析、第 111 回日本眼科学会総会 2007 年 4 月 20 日、大阪国際会議場 (大阪府)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

桜井 真由美 (SAKURAI MAYUMI)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：50303269

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

杉山 和久 (SUGIYAMA KAZUHISA)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：80179168  
(H19：研究分担者)

東出 朋巳 (HIGASHIDE TOMOMI)  
金沢大学・附属病院・講師  
研究者番号：20291370  
(H19：研究分担者)

武田 久 (TAKEDA HISASHI)  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号：40436811  
(H19：研究分担者)

(4) 研究協力者

高 延琳 (GAO YANLIN)  
金沢大学・医学系研究科・大学院生