

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2013
課題番号：23791972
研究課題名（和文） 加齢黄斑変性患者における感受性遺伝子多型とサイトカインの関連性
研究課題名（英文） Genetic susceptibility and cytokines levels in patients with age-related macular degeneration
研究代表者 櫻田 庸一（SAKURADA YOICHI） 山梨大学・医学部附属病院・助教 研究者番号：90456476

## 研究成果の概要（和文）：

加齢黄斑変性における前房水中のサイトカイン濃度と加齢黄斑変性症感受性遺伝子多型との関連を調べた。加齢黄斑変性症患者とコントロール患者の房水中のサイトカインを VEGF, CRP 等の 14 種類のサイトカイン濃度を測定比較した。また対象者から末梢血を採取し、DNA を抽出 TaqMan 法で加齢黄斑変性の感受性遺伝子多型である ARMS2(rs10490924) 及び CFH(rs800292) の遺伝子型を決定した。加齢黄斑変性患者では、コントロール患者と比較して有意に房水中 CRP 濃度が上昇していた。房水中 CRP 濃度と CFH 及び ARMS2 遺伝子多型と関連は認められなかった。滲出型典型加齢黄斑変性とポリープ状脈絡膜血管症の房水中サイトカイン濃度に違いは見られなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

We investigated the association between aqueous humor cytokine levels and genetic susceptibility in patients with age-related macular degeneration. Fourteen cytokines were investigated including C-reactive protein (CRP) and vascular-endothelial growth factor (VEGF). Aqueous CRP level was significantly higher in patients with age-related macular degeneration than that in controls. We genotyped two major genetic loci in age-related macular degeneration. (i. e. rs10490924 in ARMS2 gene and rs800292 in CFH gene). There was no association of aqueous CRP level with ARMS and CFH variants. There were not any differences in aqueous humor cytokines level between exudative typical age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

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、サイトカイン、遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症は、本邦では糖尿病網膜症、緑内障、網膜色素変性症に次ぎ後天的失明原因の第 4 位であり、生活スタイル、特に食生活の欧米化や平均余命の上昇に伴い、増加傾向にある難治性の眼疾病であり、今後ますます

ます増加することが見込まれる。

加齢黄斑変性は、萎縮型(dry)と滲出型(wet)の 2 つのタイプに分類されるが、白人は萎縮型が多いのに対して、本邦の加齢黄斑変性は、滲出型がその大部分を占めるのが特徴である。

加齢黄斑変性症は、これまで複数の遺伝的要因に喫煙習慣や食習慣などの環境的要因が影響し発症すると考えられており、アメリカにおける双生児の追跡研究においても、加齢黄斑変性症は強い遺伝的要因の影響のもとに発症することが示唆されていた。

2005年頃より、白人を対象に、全ての遺伝子を網羅的に解析する genome-wide association study (GWAS) が加齢黄斑変性症患者を対象に施行され、これまでに、いくつかの加齢黄斑変性症の感受性遺伝子が報告されているが、その多くは白人を対象とした研究からの報告であり、そのすべての遺伝子多型が、必ずしも日本人にとっての危険因子であるわけではないことが明らかになっている。

加齢黄斑変性の感受性遺伝子多型の中でも、1番染色体に位置する補体因子Hと10番染色体に位置する age-related maculopathy susceptibility2 (ARMS2) 遺伝子多型（以前までは LOC387715 遺伝子多型と呼ばれることもあった）は、加齢黄斑変性発症に対して非常に強い相関を示し、日本人では CFH 遺伝子多型 rs800292 は、1.7-2.0 倍程度の odds ratio を示し、また ARMS2 遺伝子多型 rs10490924 は、2.5-3.5 倍程度の odds ratio を示す遺伝子多型である。

補体因子(CFH) は、補体経路（主経路、副経路、及びレクチン経路）の内、複経路の制御に関連していると報告されており、補体経路の破綻により過剰な炎症を引き起こし、その結果加齢黄斑変性の発症に至ると考えられている。CFH は加齢黄斑変性の感受性遺伝子として1番最初に報告された遺伝子であり、CFH 遺伝子の突然変異により溶血性尿毒症症候群や膜性増殖性糸球体腎炎などの腎疾病との関連も報告されている。

ARMS2 遺伝子は、CFH 遺伝子に次ぎ、2番目に加齢黄斑変性症の感受性遺伝子として報告されて遺伝子である。これまでに ARMS2 遺伝子の機能に関しては、様々な報告があるものの眼内での機能に関して明らかになっていないのが現状ではあるが、この遺伝子多型も CFH 遺伝子多型とは、独立して補体経路の炎症の制御や誘発に関与していることが、加齢黄斑変性症患者の血漿中の補体物質の濃度と遺伝子多型との関連解析研究から明らかになっている。

加齢黄斑変性症は、慢性炎症性疾患であるた

め、全身的な炎症指標の1つである血漿中の C-reactive protein(CRP)が上昇していると報告されている。また白人においては加齢黄斑変性患者における血漿中の CRP 濃度と CFH 遺伝子多型に関連があるとの報告

(CFH 遺伝子多型のリスクアレルを多く持つほど、血漿中の CRP 濃度が高い) もあり、加齢黄斑変性症は、眼局所の疾患というよりは、全身を含めた炎症疾患であることが示唆されているが、これまで加齢黄斑変性症患者における眼局所での炎症性サイトカイン濃度と加齢黄斑変性感受性遺伝子多型との関連に関する報告がなかったため、今回の研究では、これらの点を解明すべく研究を行うことを研究の主眼とした。

日本人における加齢黄斑変性症には、3つの subtype(滲出型典型加齢黄斑変性、ポリープ状脈絡膜血管症、網膜血管腫状増殖)が存在するが、临床上、視力予後や治療反応性、発症年齢、男女比、および遺伝的背景が異なることが知られている。

本研究では、房水中サイトカイン濃度でこれらの subtype に違いが認められるか否かを、日本人滲出型加齢黄斑変性に多く見られる subtype である、滲出型加齢黄斑変性とポリープ状脈絡膜血管症のサイトカイン濃度を比較することを介して、両疾患の異同を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

1) 加齢黄斑変性と眼底に異常のない正常コントロール患者での房水中サイトカイン濃度の比較を行い、加齢黄斑変性に関連している房水中サイトカインを同定すること。

2) さらに加齢黄斑変性の感受性遺伝子多型として確立されている CFH (rs800292) および ARMS2(rs10490924)遺伝子多型が、房水中のサイトカイン濃度に関連しているかどうかを検討し、現在までその機能の解明が進んでいない ARMS2 遺伝子の機能を解明すること。

3) 加齢黄斑変性症の subtype の中でも、もっとも頻度の高い典型滲出型加齢黄斑変性(Typical AMD)とポリープ状脈絡膜血管症(PCV)に分類を行い、これらのサイトカイン濃度の比較も行い、subtype 特異的に上昇しているサイトカインを同定することによ

り、現在よりもより良い治療（個別化医療）につながる可能性があるかどうか検討を行うこと。

### 3. 研究の方法

加齢黄斑変性症患者の房水の採取は、抗 VEGF 抗体（ルセンチス硝子体注射）治療時に、イソジンによる眼瞼消毒の後に、眼表面と結膜を8倍希釈のイソジンで十分に消毒したのち、スクレロトームで周辺角膜にポートを作成し、ポートから1ccのツベルクリンシリンジの先に30G針を付着させ、房水を0.10ml程度採取した。

正常コントロールとして眼底病変の無い患者を白内障手術時に、眼瞼および眼表面、結膜をイソジン消毒し、生理食塩水で消毒を流した後、角膜にサイドポートを作成し、粘弾性物質を前房内に充填する前に前房水約0.10mlを、30G針を先端に付着させた1.0mlのシリンジで採取した。

房水中のサイトカイン濃度は、同時に複数のサイトカイン濃度測定することのできるELISA kitを用いて、解析を行った。

遺伝子型の同定は、末梢血の採取は、加齢黄斑変性患者では、造影検査時に、また正常コントロール患者では、手術時の点滴のルート確保時に行った。その後DNAの抽出キットを用いてDNAを抽出し、加齢黄斑変性感受性遺伝子多型CFH(rs800292)及び

ARMS2(rs10490924)は、TaqMan法を用いてReal Time PCR7300/7500を用いて解析を行った。

前房水採取および血液採取に関しては、山梨大学倫理委員会の承認のもと、全ての加齢黄斑変性患者および正常コントロール患者から書面による同意を得たうえでやっている。

### 4. 研究成果

1) 房水中のCRPを含む、複数の炎症性サイトカインで有意に加齢黄斑変性患者の房水中濃度がコントロール群よりも上昇していた。加齢黄斑変性の剖検眼では脈絡膜や網膜色素上皮でCRP濃度が増加していることが報告されているが、今回の結果より、加齢黄斑変性症眼では、CRPをはじめとした炎症性サイトカインが前房レベルにまで達していることが示唆された。

2) これまで、Typical AMDとPCVの房水中

濃度を比較した報告は1報のみあるが、Typical AMDではPCVと比較して有意に房水中のVEGF濃度が高い傾向があると報告されているが、今回のsubtype解析では、Typical AMDとPCVの房水中サイトカイン濃度はいずれも有意差がなかった。これは、加齢黄斑変性患者におけるVEGFの発現が黄斑という網膜全体からするとかなり限られた場所で発現しているために、前房水中にその発現が反映されにくいことと関連しているかもしれない。また炎症性サイトカインの房水中濃度でTypical AMDとPCVの鑑別は出来なかった。また本研究では網膜血管腫増殖に関しては、サンプル数が少なかったが、Typical AMDとPCVよりもVEGF濃度が高い傾向が認められたが、もう少しサンプル数を増やしたうえでの検討が必要である。

3) 感受性遺伝子多型との関連との解析では、明らかな関連は見られなかった。特に房水中CRP濃度とCFH遺伝子多型との関連に関しては、加齢黄斑変性症患者では、いずれの遺伝子型でも房水中CRP濃度が上昇しているのに対し、正常コントロールでは、CFH遺伝子多型のいずれの遺伝子型も低下しており、今回の研究におけるサンプル数では、有意差がみられるレベルになく、300症例以上の検体数を用いた上での検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕(計4件)  
(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4件)

1) Systemic risk factors associated with polypoidal choroidal vasculopathy and neovascular. age-related macular degeneration. Retina 2013 33(4)841-5

Sakurada Y, Yoneyama S, Imasawa M, Iijima H (査読あり)

2) Association of genetic variants on 8p21 and 4q12 with age-related macular degeneration in Asian populations.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2012 53(10)6576-81

Nakata I, ·, Sakurada Y, ·, Yoshimura N (査読あり)

3) Association between genetic variants associated with vertical cup-to-disc ratio

and phenotypic features of primary open-angle glaucoma. Ophthalmology 2012 119(9)1819-25

Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S.

(査読あり)

4) Recurrence of macular edema associated with branch retinal vein occlusion after intravitreal bevacizumab. Jpn J Ophthalmol 2012 56(2)165-174

Hanada N, Iijima H, Sakurada Y, Imasawa M. (査読あり)

[学会発表] (計3件)

- 1) ポリープ状脈絡膜血管症の表現型と ARMS2 遺伝子多型 2013年4月6日 櫻田庸一 日本眼科学会 東京
- 2) 加齢黄斑変性に対するルセンテイス硝子体注射1年後の視力関連因子 2013年4月4日 米山征吾 日本眼科学会
- 3) ポリープ状脈絡膜血管症の中心窩脈絡膜厚 2012年12月1日 米山征吾 日本網膜硝子体学会

[その他]

ホームページ等

[http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A\\_Displnfo.Scholar/3\\_77/B50DC66690BAB9F1.html](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Displnfo.Scholar/3_77/B50DC66690BAB9F1.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻田 庸一 (SAKURADA YOICHI)  
山梨大学 医学部附属病院 助教  
研究者番号：90456476