



# 眼疾患バイオマーカーの探索

岩田 岳

IRYO Vol. 62 No. 9 (512-515) 2008

キーワード：眼，遺伝子，遺伝子多型，シーケンサー，予防医学

## はじめに

近年ゲノム配列や体内のタンパク質を分析して疾患の発症を予測する研究が行われている。この背景には飛躍的な技術革新によるゲノム解析技術や質量分析を用いた微量タンパク質の網羅的解析技術などの進歩がある。これらの技術はすでに多くの疾患で成果を上げており、眼科分野でも応用されている。患者の眼球において、まだ生理機能が保持されている環境では再生医療を、そして環境が破綻している場合には人工網膜等による視力回復が検討されている。本章ではこれらの研究に加え、未発症の患者予備軍を選別し、病気の予防あるいは遅延を目的とした予防医学について、その選別部分について最近の研究を紹介したい。

## 感覚器症例情報収集システムの構築

眼球内部は透明な組織で構成されていることから容易に組織内部を観察できる一方、生検することがきわめて困難な組織でもある。したがって早期診断に利用できるサンプルは涙液、血液、尿に限られ、必然的に研究対象は白血球のDNAと血漿成分に絞られる。また、手術中に破棄される房水、硝子体の

一部についても倫理委員会の承認と患者の同意があれば研究材料として利用できる。われわれはこれらのDNAや体液から疾患と相関する疾患バイオマーカーの探索を行っている。平成15年、国立病院機構および厚生労働省の支援を受けて、オンラインによる症例情報の収集とDNA・血漿バンクの設立を目的とした「感覚器ネットワーク」を東京医療センター臨床研究センター（感覚器センター）に構築した（図1）。関連施設の国立病院および大学病院から白内障、緑内障、加齢黄斑変性、網膜色素変性の症例情報をウェブ画面上から登録し、同時に検体を受け取る仕組みである。症例情報には個人情報を除く患者の臨床所見が詳細に登録できるようになっており、眼底写真の添付も可能である。遺伝子やタンパク質の解析結果は症例情報と一体化され、個々の患者についてデータベースが構築されることによって、疾患バイオマーカーの探索をより容易にしている。

## 遺伝子解析による加齢性眼疾患の感受性遺伝子の探索

これまでの研究から加齢性眼疾患の多くは多因子疾患（遺伝、習慣、環境）であると考えられている。

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  
別刷請求先：岩田岳 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  
〒152-8902 目黒区東が丘2-5-1  
(平成20年7月18日受付)

Series of Articles on Sensory Disorders No. 9

Search for Biomarker of Ocular Diseases

Takeshi Iwata

Key Words : eye, gene, single nucleotide polymorphisms, DNA sequencer, preventive medicine

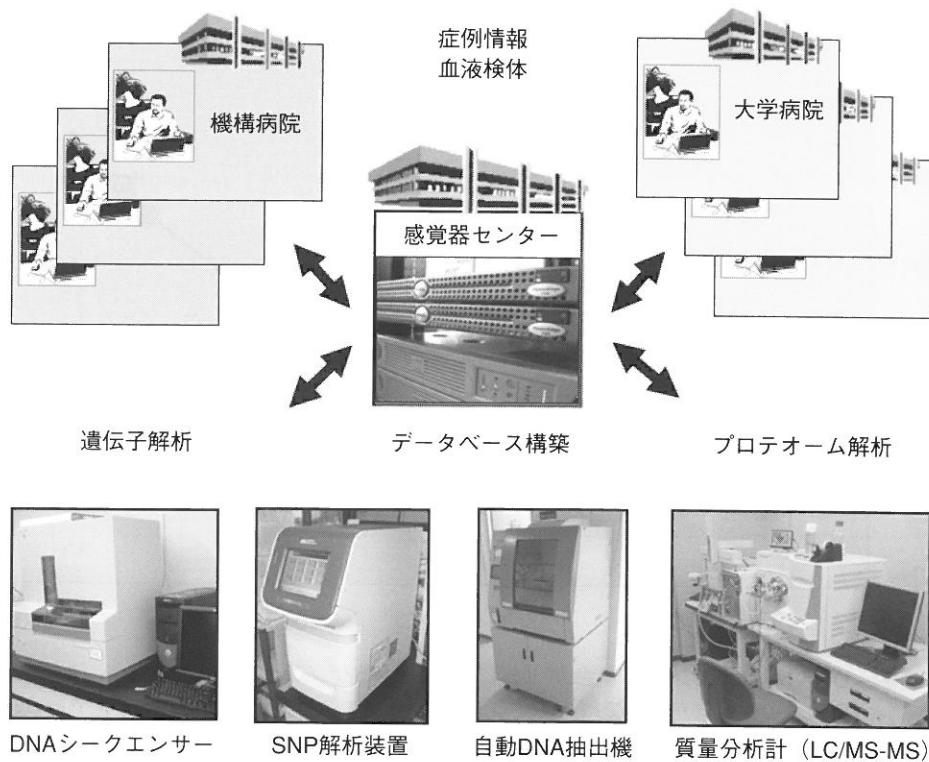


図1 感覚器センターに設置された症例情報システムと各種分析装置

加齢黄斑変性の場合、加齢、遺伝、喫煙、肥満、青い光などがリスク因子として報告されている。とくに遺伝因子（感受性遺伝子）については技術的な進歩によって全ゲノムを対象とした患者と健常者の比較が可能になっている。ヒトゲノムプロジェクトによってヒトゲノムには約22,000個の遺伝子が存在し、平均で1,000塩基に1つの割合で配列が個々に異なることが明らかになった。この一塩基配列の変化である遺伝子多型：Single Nucleotide Polymorphism (SNP) を組み合わせてブロックにし、比較することによって感受性遺伝子の染色体上の位置を調べることができる。SNPの組み合わせをハプロタイプと呼ぶが、複数の国が参加して、すべてのハプロタイプを明らかにする国際ハップマッププロジェクト (International HapMap Project, <http://www.hapmap.org/>) が進行中である。

ゲノム上には1千万個のSNPが存在すると計算されるが、これだけのSNPを患者個々に解析することは困難であった。しかし、最近SNPアレーの開発が進み、50万-100万種類のSNPを同時に検出することができるようになってきている。このチップを利用して全SNPの5-10%しかカバーできないが、感受性遺伝子の位置情報、病気との相関（頻度、オ

ッズ比）について有用な情報が得られる。われわれはこの方法によって白内障、緑内障、加齢黄斑変性、偽落屑症候群の感受性遺伝子について解析している。疾患と相関するSNPは疾患を発症する塩基配列と物理的に近い位置に存在すると考えられるが、そのものではないことが多い。これはハップマッププロジェクトが健常者を対象にして作成されたデータベースであり、患者のSNPは登録されていないからである。発症原因の塩基配列を知るためにはSNP間の塩基配列をDNAシーケンサーで読むしかない。近年この塩基配列解読についても驚異的な技術革新が進行している（図2）。1990年にアメリカエネルギー省と厚労省によって30億ドルの予算で開始されたヒトゲノムプロジェクトが10年間かけて解読した30億塩基を1日で解読するDNAシーケンサーがアメリカPacific Bioscience社を含む複数の会社から発表される予定である。アメリカではヒトゲノムを1,000ドルで完全解読する1,000ドルゲノムプロジェクトが進行しており、今後SNPアレーからゲノム配列を患者と健常者で直接比較することによってより詳細な情報が得られると考えられる。また、DNAシーケンサーの感度が上がり、必要なDNA量も年々減少している。このことから採血は不要と

DNAシーケンサーの解析量（塩基数／台／日）

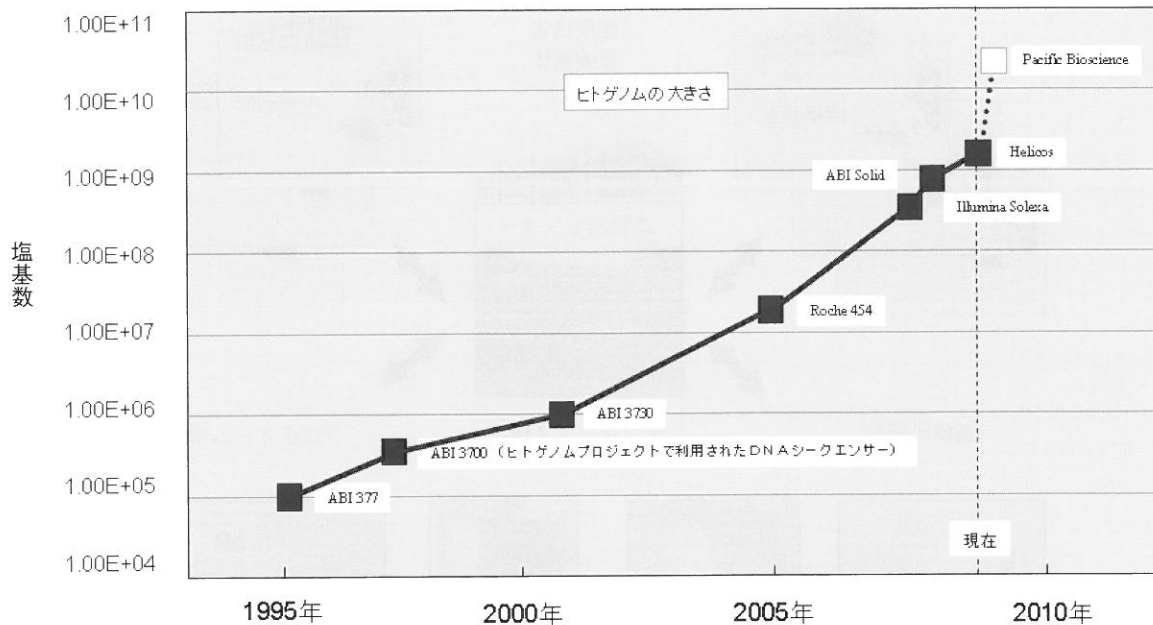


図2 DNAシーケンサー1台が1日に解読できるゲノム塩基数  
1人のゲノムが1日で解読できるDNAシーケンサーが発表される予定である。

なり、爪や髪の毛から抽出されるDNA量でも十分な解析が可能になると予測される。

近年の研究によってゲノム上の2%の配列が約22,000遺伝子をコードし、残り70%の配列からRNAが生成され、このRNAが遺伝子発現やタンパク質合成の制御に関係していることが明らかになってきた。このようなタンパク質を合成しないRNA(ncRNA: non-coding RNA)が眼疾患にも関わっている可能性は高く、感受性遺伝子に加え、感受性ncRNAについても積極的に研究を進めている。

### ● 眼疾患のためのプロテオミクスとバイオマーカーの探索

感受性遺伝子が明らかにされ、発症の有無が判断できるようになっても、個々の患者の発症時期を予測することは困難である。体内を循環する血液や排泄される尿の成分を分析することによって発症時期を予測する研究が行われている。近年、質量分析計が飛躍的に進歩し、コンピューターソフトによる機械の操作性も改善されたことから、専門の技官でなくても操作できるようになってきた。発現しているタンパク質の総称をプロテーム、その分析方法をプロテオミクスというが、今回われわれは白内障、緑内障、加齢黄斑変性の患者から血漿を集め、質量分

析計を用いた血漿プロテオミクスを行った。血漿にはアルブミン、グロブリンなど20種類のタンパク質が重量換算で99%を占めており、これらを除去しなければ疾患によって変動する微量タンパク質を質量分析計の検出できる感度で捕捉することが困難である。そこでわれわれは東レ株式会社との共同研究によって低分子のタンパク質だけを分離・濃縮する分画装置を開発し、患者血漿の分画を試みた(図3)。分画成分はさらに逆相クロマトグラフィー、トリプシン処理、2次元クロマトグラフィーによる分離を経て、イオントラップ型質量分析計によってタンパク質の同定が行われた。その結果、白内障、緑内障、加齢黄斑変性からそれぞれ固有に17、15、21種類のタンパク質が同定され、現在これらのタンパク質についてELISAやウエスタンブロットによって確認作業を進めている。同様な方法によって涙液、房水、硝子体液など眼由来の体液についても解析を行う予定である。また、今回同定されたタンパク質情報の確認作業と遺伝子多型情報と症例情報に結びつけるための作業を行っている。

### ● おわりに

眼疾患のバイオマーカー探索として遺伝子解析と質量分析計を用いた眼疾患プロテオミクスについて

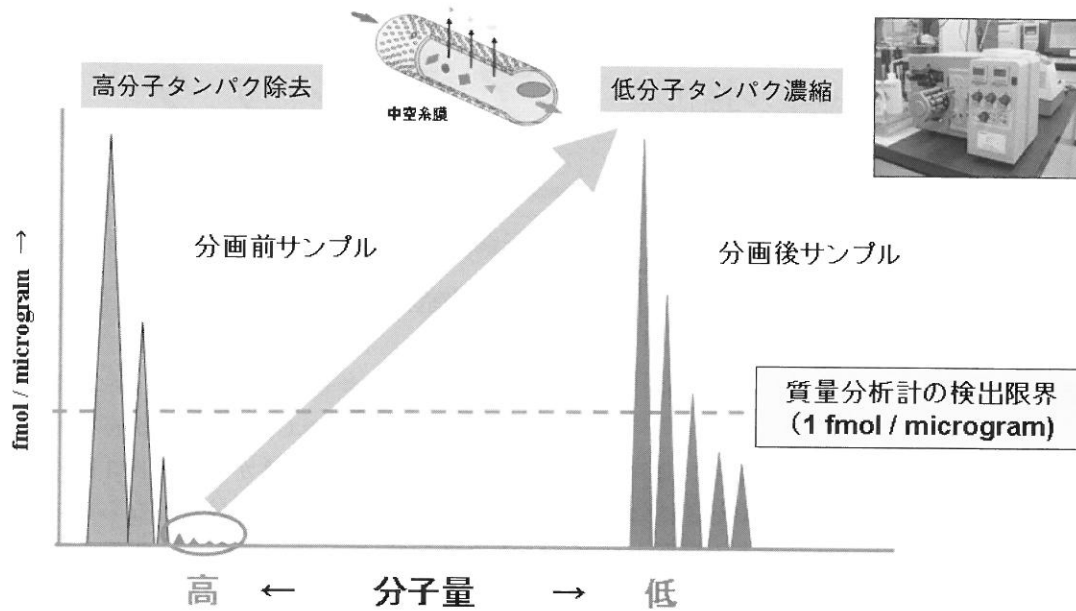


図3 中空糸膜を用いた低分子分画装置による微量タンパク質の濃縮  
東レ株式会社が開発した分画装置によって、選択的に低分子（50KDa以下）の血漿タンパクを質量分析計で検出できる濃度に調製できるようになった。

紹介した。これまでに日本人と欧米人との間で疾患と相関する遺伝子多型が一致しないことがたびたび報告されている。しかし、日本人と体質がより近いと考えられるアジアの人々と連携しながら研究が進めば、日本人で発見された疾患バイオマーカーを利用して、広くアジアの患者の早期診断にも利用できる可能性がある。

[参考文献]

- 1) 岩田岳. 遺伝子解析の現状, またその行方は? 打倒! 加齢黄斑変性, 眼科インストラクションコース. メディカルビュー社; 2005: p20-3.
- 2) 岩田岳. 加齢黄斑変性の遺伝子研究の最前線, 特集: 網膜脈絡膜変性疾患のアップデート. あたらしい眼科 2006; 23: 1125-31.
- 3) Okamoto H, Umeda S, Obazawa M et al. Complement Factor H Polymorphisms in Japanese Population with Age-Related Macular Degeneration. Mol Vis 2006; 12: 156-8.
- 4) 岩田岳. 網膜・硝子体のプロテオーム解析, 日の眼科 2007; 78: 577-82.
- 5) Yoshida T, Wan AD, Zhang H et al. HTRA 1 Promoter Polymorphism Predisposes Japanese to AMD. Mol Vis 2007; 13: 545-8.