

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20322

研究課題名(和文)網膜格子状変性を対象としたII型およびIV型コラーゲン遺伝子の網羅的な解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the association between type II/IV collagen genes and lattice degeneration of the retina

研究代表者

國分 沙帆(Kokubu, Saho)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：60771590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：網膜格子状変性は複数の疾患感受性遺伝子が重なることにより発症する多因子疾患であると考えられている。近年、我々のグループは眼組織の主要な構成成分であるII型およびIV型コラーゲンをコードする遺伝子が網膜格子状変性の発症に関与することを見出している。本研究では、II型およびIV型コラーゲンをコードする遺伝子群を対象に詳細な遺伝子解析を実行し、網膜格子状変性と有意な相関を示したII型およびIV型コラーゲン遺伝子内のSNPを複数同定した。同定したSNPを対象に機能解析を実行した結果、同定したSNPの一部が関連コラーゲン遺伝子の発現量の変動に影響を与える可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Lattice degeneration of the retina is currently thought to be triggered by various genetic as well as environmental factors. Our recent studies have reported that collagen type II and IV genes contribute to the development of lattice degeneration of the retina. In this study, we performed a comprehensive analysis of the association between type II/IV collagen genes and lattice degeneration of the retina and identified SNPs in these genes associated with the risk of the disease. eQTL analysis showed the possibility that some of the SNPs identified in this study could affect the expression level of collagen type II and IV genes.

研究分野：眼科

キーワード：網膜格子状変性 遺伝子 SNP コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜格子状変性とは、眼球の赤道部から周辺部網膜において、鋸状縁と平行に走る紡錘形の境界不鮮明な菲薄化した網膜変性のことであり、その特徴として、限局性網膜菲薄化、隣接硝子体ゲルの液化、および変性巣周縁での網膜と硝子体の強固な癒着が挙げられる。

(2) 網膜格子状変性では、変性巣周縁に付着した硝子体が後部硝子体剥離形成時に強く網膜を牽引しているため、外部衝撃や加齢により変性巣の周縁に網膜裂孔や網膜剥離を形成することもあり、網膜剥離人口の約半数がこの網膜格子状変性に起因していると言われている。また、網膜格子状変性を持つことで、網膜剥離を発症するリスク(相対危険率: relative risk)がおよそ10倍になることも明らかになっている。加えて、ジストロフィの一所見として現れることも報告されている。

(3) 網膜格子状変性は稀な疾患ではなく、本邦のみならず全世界で観察される。網膜格子状変性の発症頻度に人種間・民族間差は認められず、全人口の約1割が網膜格子状変性を罹患していると考えられている(Byer NE. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol. 1965; 69(6): 1065-1081. Staatsma BR, et al. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol. 1974; 78(2): 87-113. Byer NE. Surv Ophthalmol. 1979; 23(4): 213-248.)。しかしながら、網膜格子状変性は自覚症状が全くないため、健康診断や通常の眼科診察では見落とされやすく、重度の視力低下が懸念される網膜裂孔や網膜剥離を発症してから初めて網膜格子状変性を発症していたことを知るケースがほとんどである。そのため、網膜格子状変性の予防、あるいは網膜格子状変性の迅速かつ簡便な診断法を確立することは、世界的に見ても大変意義深いことであるといえる。

(4) 網膜格子状変性の発症メカニズムおよび病態は明確ではないものの、網膜格子状変性は特定の遺伝要因のもとに何らかの環境要因が複合的に作用して発症する多因子遺伝性疾患であると考えられている(Murakami F, et al. Ophthalmologica. 1982; 185(3): 136-140.)。しかしながら、網膜格子状変性の発症に關与する遺伝要因(疾患感受性遺伝子)の同定を目的とした研究は極めて少なく、未だ疾患感受性遺伝子の明確な特定には至っていないため、網膜格子状変性の予防および早期発見・早期治療は遅々として進展していないのが現状である。

(5) 近年、我々のグループは、日本人網膜格子状変性患者を対象に遺伝子解析を実行し、2012年に、網膜格子状変性と有意に相関

する遺伝子として、IV型コラーゲンをコードするCOL4A4(collagen type IV alpha 4)遺伝子を報告した(Meguro A, et al. PLoS One. 2012; 7(6): e39300. DOI: 10.1371/journal.pone.0039300.)。また、2014年には、II型コラーゲンをコードするCOL2A1(collagen type II alpha 1)遺伝子が網膜格子状変性の候補遺伝子となり得る可能性を見出している(Meguro A, et al. ARVO Annual Meeting 2014.)。

(6) コラーゲンは結合組織を構成する主要なタンパク質であり、眼を含む様々な組織で重要な役割を担っている。ヒトのコラーゲンタンパク質は30種類以上あることが報告されているが、網膜内層と硝子体境界面の形成不全が網膜格子状変性の基にあると考えられるため、硝子体に多く存在するII型コラーゲンおよび網膜内境界膜に存在するIV型コラーゲンの異常が網膜格子状変性の発症に關与している可能性が高いことが推察される。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、II型コラーゲン遺伝子およびIV型コラーゲン遺伝子群を対象に、網羅的で高密度な遺伝子多型解析を実行し、網膜格子状変性の発症リスクと統計学的に有意な相関を示すII型コラーゲン遺伝子多型またはIV型コラーゲン遺伝子多型の網羅的な同定を目的とする。

(2) さらに、(1)の遺伝子多型解析で網羅的に同定した遺伝情報をもとに、関連コラーゲン遺伝子の機能解析を実行し、II型コラーゲン遺伝子およびIV型コラーゲン遺伝子を介する網膜格子状変性の発症メカニズムの解明を行う。

(3) 本研究の成果は、遺伝要因を対象とした網膜格子状変性の新規治療薬の開発につながり、その医学的意義は大変高いと考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) II型コラーゲンをコードする遺伝子はCOL2A1の1種類であり、IV型コラーゲンをコードする遺伝子はCOL4A1、COL4A2、COL4A3、COL4A4、COL4A5およびCOL4A6の6種類が存在する。本研究では、日本人集団(網膜格子状変性患者709例および健常者1,524例)を用いて、II型コラーゲン遺伝子領域およびIV型コラーゲン遺伝子領域を対象に網羅的なSNP(single nucleotide polymorphism: 一塩基多型)解析を実行し、網膜格子状変性患者および健常者におけるII型コラーゲン遺伝子領域およびIV型コラーゲン遺伝子領域のSNPの遺伝子型情報を取得する。本研究のすべての参加者(網膜格子状変性患者709例および健常者1,524例)の間に血縁関係は

認められなかった。

(2) 網膜格子状変性患者および健常者から採取した末梢血から QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen 社) を用いてゲノム DNA の抽出および精製を実行し、SNP 解析の実験材料として使用した。DNA の変性を防止するため、Qiagen 社のプロトコルを準拠して、一定の条件・手順の下にゲノム DNA の抽出および精製の作業を実行した。

(3) II 型コラーゲン遺伝子領域および IV 型コラーゲン遺伝子領域内の SNP 解析は TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイにより実行した。TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイは Life Technologies 社のプロトコルを準拠して行い、II 型コラーゲン遺伝子領域および IV 型コラーゲン遺伝子領域に位置するタグ SNP (tag SNP) の選択は、国際 HapMap 計画 (International HapMap Project) (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) の日本人集団 (Phase III) のデータをもとに、マイナーアレル頻度が 5%以上、 $r^2$  が 0.8 以上の条件で II 型コラーゲン遺伝子領域および IV 型コラーゲン遺伝子領域をカバーするタグ SNP を選択した。

(4) TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイにより取得したタグ SNP の遺伝子型情報を用いて、II 型コラーゲン遺伝子領域および IV 型コラーゲン遺伝子領域を対象に SNP の Imputation 解析を実行した。本 Imputation 解析では、TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイにより遺伝子型判定が行われなかった II 型コラーゲン遺伝子領域および IV 型コラーゲン遺伝子領域内の SNP の遺伝子型を imputation (推定) し、遺伝子領域内のより高密度で網羅的な SNP のアレル情報および遺伝子型情報を取得した。

(5) Imputation 解析は、MACH v1.0 ソフトウェア (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/MACH/index.html>) を用いて実行した。Imputation 解析のリファレンスパネルには、1000 人ゲノムプロジェクト・フェーズ 3 (1000 Genomes Project Phase 3) (<http://www.1000genomes.org/>) の東アジア人集団 315 例のデータセットを使用した。東アジア人集団 315 例の内訳は東京在住の日本人集団 (JPT: Japanese samples from Tokyo) 104 例、中国・北京在住の中国漢民族 (CHB: Han Chinese from Beijing) 103 例、中国南部在住の中国漢民族 (CHS: Southern Han Chinese) 108 例である。Imputation 解析により網羅的に取得した SNP (Imputed SNP) の採用基準はハーディー・ワインベルグ平衡  $P$  値  $> 0.001$ 、マイナーアレル頻度  $> 1\%$  および  $R$ -squared (Imputation された SNP の遺伝子型と実際の遺伝子型の間的一致率を示す決定係数)  $> 0.90$  であり、採用基準をすべて満たす

Imputed SNP を患者・健常者間の関連解析に用いた。

(6) Imputation 解析により取得した II 型コラーゲン遺伝子領域および IV 型コラーゲン遺伝子領域を高密度に網羅する SNP のアレル情報および遺伝子型情報について、網膜格子状変性患者と健常者の間でアレル頻度および遺伝子型頻度の比較 (関連解析) を行い、II 型コラーゲン遺伝子領域および IV 型コラーゲン遺伝子領域内の SNP と網膜格子状変性の相関性を網羅的に評価し、網膜格子状変性と統計学的に有意な相関を示す SNP の同定を行った。

(7) 網膜格子状変性と統計学的に有意な相関を示した SNP が位置する II 型コラーゲン遺伝子または IV 型コラーゲン遺伝子を対象に機能解析 (eQTL (expression Quantitative Trait Locus) 解析、タンパク質の立体構造解析) を実行した。

(8) プロモーター領域、イントロン領域および非翻訳領域に位置する SNP は、遺伝子発現量の制御に関与することが知られている。したがって、本研究では、同定した SNP がプロモーター領域、イントロン領域または非翻訳領域に位置するとき、同定した SNP と SNP が位置するコラーゲン遺伝子を対象に eQTL 解析 (遺伝子発現解析) を実行した。本 eQTL 解析では、TaqMan リアルタイム PCR アッセイを用いて遺伝子の発現量を定量し、SNP の遺伝子型の変動における遺伝子発現量の比較を実行した。TaqMan リアルタイム PCR アッセイは Life Technologies 社のプロトコルを準拠して行った。

(9) エクソン領域内のアミノ酸置換を伴う SNP (non-synonymous SNP (非同義置換 SNP)) は発現するタンパク質の機能に直接的に影響を与える可能性がある。したがって、本研究では、同定した SNP が non-synonymous SNP であるとき、同定した SNP が発現コラーゲンタンパク質の機能にどのような影響を与えるかについて立体構造解析により評価・検討した。アミノ酸置換前後のタンパク質の構造および分子動力の変化を評価するとともに、他のタンパク分子との相互作用・ドッキング作用の変動を評価した。本研究における立体構造解析では、主に Modeller ソフトウェア (<http://salilab.org/modeller/>) および Meta-PPISP ウェブサーバー (<http://pipe.scs.fsu.edu/meta-ppisp.html>) を用いて non-synonymous SNP に起因するアミノ酸置換前後のコラーゲンタンパク質の構造および機能の変化の評価を行った。

(10) 本研究では、すべての血液検体提供者 (網膜格子状変性患者、健常者) に対して本研究の目的、研究の期間と方法、予測される

効果および危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、本研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分に説明し、インフォームド・コンセントを得た上で本研究に参加していただいた。得られた血液検体提供者各々の個人情報は連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者によって厳重に管理されている。

#### 4. 研究成果

(1) II 型コラーゲン遺伝子領域および IV 型コラーゲン遺伝子領域を高密度に網羅する SNP を対象とした関連解析により、網膜格子状変性の発症リスクと統計学的に有意な相関を示す II 型コラーゲン遺伝子領域の SNP および IV 型コラーゲン遺伝子領域の SNP を複数同定した。

(2) 同定したイントロン領域または非翻訳領域に位置する SNP を対象にコラーゲン遺伝子の eQTL 解析を実行した結果、同定した SNP の一部が関連コラーゲン遺伝子の発現量の変動に影響を与える可能性を示唆した。したがって、同定したイントロン領域または非翻訳領域に位置する SNP の一部では、SNP に起因する関連コラーゲン遺伝子の発現量の変動が網膜格子状変性の発症に関与することが示唆された。

(3) 一方、同定した non-synonymous SNP と発現コラーゲンタンパク質を対象とした立体構造解析では、発現コラーゲンタンパク質の構造および機能に直接的に有意な影響を与える non-synonymous SNP は認められなかった。

(4) 本研究で得られた II 型コラーゲン遺伝子領域および IV 型コラーゲン遺伝子領域の SNP 情報は、網膜格子状変性の発症メカニズムの解明の一助になるだけでなく、網膜格子状変性における遺伝子診断構築の基礎となり、健康診断などでの迅速な網膜格子状変性の遺伝子診断の構築につながることを期待される。

(5) 網膜格子状変性は重度の視力低下が懸念される網膜裂孔や網膜剥離の大きな危険因子（リスクファクター）であるため、遺伝子診断により網膜格子状変性発症の有無を簡便・迅速に知ることができれば、網膜裂孔や網膜剥離の早期予防も可能となり、患者本人に与える医学的価値は大変高いと考えられる。

(6) 網膜裂孔や網膜剥離の早期発見・早期予防は、これら疾患に起因する重度の視覚障害者の減少につながり、患者本人の QOL（Quality of Life：生活の質）の向上に貢献することができる。また、重度の視覚障害

者の減少は保健医療および社会保障にかかるコストの削減などにもつながるため、網膜裂孔や網膜剥離の早期発見・早期予防は、社会的にも経済的にも貢献度は大変高いと考えられる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

國分 沙帆 (KOKUBU, Saho)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：60771590

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

目黒 明 (MEGURO, Akira)

水木 信久 (MIZUKI, Nobuhisa)

出田 隆一 (IDETA, Ryuichi)

南波 玲子 (NANBA, Reiko)