

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11460

研究課題名（和文）広義原発開放隅角緑内障重症化の遺伝的要因の解明

研究課題名（英文）Evaluation of genetic factors for deterioration of primary open angle glaucoma

研究代表者

森 和彦（Mori, Kazuhiko）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：40252001

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：定期的経過観察を行っている広義原発開放隅角緑内障患者の視野検査結果をもとに緑内障重症例の判定方法を検討した。視野進行速度、ハンフリー視野検査のAulhorn分類Greve変法病期、ゴールドマン視野検査の湖崎分類病期、緑内障進行判定プログラムによる検討を行った。全ゲノム解析から取得したジェノタイプングデータから緑内障重症例の判定方法別の各SNPのジェノタイプの頻度計算を実施した。同定したSNPを各判定法別に比較したところ、重症化判定方法の組合せによってボンフェローニ補正を超える複数の候補SNPを見つけ出すことができたが、組合せ次第ではSNPの方向性が一致せず、検体数不足による可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の緑内障関連遺伝解析の報告の問題点はいずれも疾病の発症に関するものであり、重症化に関する遺伝的リスク要因を検討した報告は存在しない。本研究では緑内障重症例の判定方法を検討し、緑内障重症化因子別に有意な候補遺伝子バリエーションを選定、将来の緑内障重症例予測遺伝子チップのプロトタイプ開発のための基礎的データを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Genome-wide association study for the severity of primary open-angle glaucoma (POAG) patients was conducted, and several SNPs related to the severity of glaucoma were obtained. However, depending on the definition of the severity, the results were not always consistent, which leads the further investigation using more subjects to improve the power of detection..

研究分野：眼科

キーワード：緑内障 重症化 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

緑内障はわが国において高い有病率を有し中途失明原因の第1位を占める極めて重要な眼疾患である。本疾患は視野障害が慢性的に進行して失明に至るため、病態解明には長期にわたる詳細な臨床情報の蓄積が必須である。申請者らは1996年から緑内障専門外来臨床データベースを構築し、現在20万件を超える臨床データをコンピュータ管理しており(図1)、種々の緑内障研究に応用してきた。

また緑内障の危険因子の1つとして家族歴があり、遺伝的要因が発症に関与することが示唆されている。申請者らは緑内障への遺伝的要因の関与を明らかにするために2005年からゲノム医化学教室と共同で緑内障患者ならびに緑内障を有しない正常対象者のDNAを収集しており、現時点での保有数は緑内障3900検体、正常2300検体を超過している(図2)。これらの検体と臨床情報をもとに、これまで広義原発開放隅角緑内障(POAG)症例418対正常300検体(500Kチップ)、症例833対正常686検体(1000Kチップ)を対象としたゲノムワイド関連解析(GWAS)^{1,2)}を行い、緑内障感受性遺伝子を報告してきた。さらにシンガポールを中心とした国際的緑内障遺伝研究にも参加し、様々な病型のバリエーションを報告している^{3,4)}。中でも2012年に報告したCDKN2B-AS1²⁾(図3)は日本人のみならず人種を超えた正常眼圧緑内障(NTG)感受性遺伝子として再現性が確認され、近年日本人においても女性NTGでさらに有意であることを報告した⁵⁾。

従来の緑内障関連遺伝解析の報告の問題点はいずれも疾病の発症に関するものであり、重症化に関する遺伝的リスク要因を検討した報告は存在しない。遺伝的検討は重症例と非重症例の2群に分離して行うため、どのような分類法が適しているかについて再検討する必要がある。すなわち緑内障重症例の定義として視野障害程度によるもの、障害進行速度によるものなどが考えられた。

申請者らは新規の症例のみならず既に全ゲノム解析を行った症例も定期的経過観察を継続しており、これら症例の視野ならびに諸検査結果をもとに緑内障重症度を分類し、それぞれのタイプ別の候補遺伝子バリエーションを絞り込むことが可能である。さらに現在も新規症例での検体収集を続けており、再現性取得実験を行うことが可能となっている。以上からPOAGの重症度別遺伝子バリエーションを調べるのみならず、病型サブクラス解析も合わせて行うことにより、NTGも含めた広義POAG症例重症度の遺伝的要因について検討可能である。

以上が本研究、広義原発開放隅角緑内障重症化の遺伝的リスク要因の解明の背景である。遺伝的要因の探索においては常に人種差の影響を考慮する必要があり、ある程度遺伝的に均質な日本人を対象とし、統計的な検出力を担保できる数を用いた大規模なケース・コントロール解析を行うことが重要である。本研究により緑内障重症化における遺伝的要因の絞り込み、さらには分子機構の解明につながる端緒となると考えた。

文献

- 1) Nakano M, Mori K, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2009, 2) Nakano M, Mori K, et al. PLoS One. 2012. 3) Aung T, Nakano M, Mori K, et al. Nature genetics, 2015, 4) Li Z, Nakano M, Mori K, et al. Human Molecular Genetics, 2015, 5) Mori K, Nakano M, et al. IOVS, 2016.

図1 KPUM緑内障外来患者データベース (KPUM-GDB)

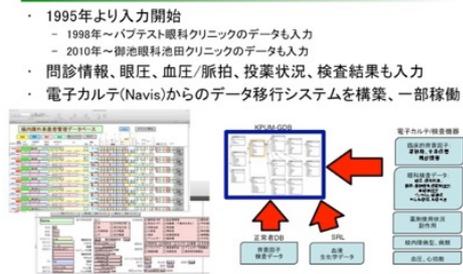
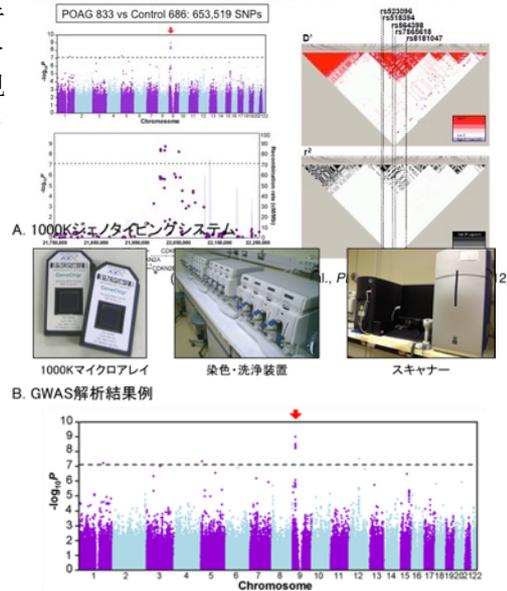


図2 国内最大規模の緑内障ゲノム情報資源



図3 Common variants in CDKN2B-AS1 associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma



【図4】ゲノム医科学教室のゲノム解析技術 1000Kジェノタイプングシステムでの解析結果を報告した。

2. 研究の目的

本研究では、広義 POAG 重症化を規定する遺伝的要因を明らかにすることを最終の目的とした。重症化の定義に関しては種々の分類が成り立つため、機能的検査である視野検査をもとにした緑内障重症例判定方法を検討、獲得されているゲノム情報から GWAS を行い、緑内障重症化因子別に有意な候補遺伝子バリエーションを選定、狭義 POAG および NTG についてサブクラス解析を行い、病型間での SNP の相違を調べることにした。さらに得られた緑内障重症因子別の遺伝子バリエーションを、現在開発中の緑内障リスク判定遺伝子チップ作成のノウハウを用いて、緑内障重症例を予測する遺伝子チップのプロトタイプ開発を目指した。

3. 研究の方法

1). 緑内障重症例の判定方法の検討

我々が定期的に経過観察を行っている全広義 POAG 患者を対象とし、これらの症例の視野検査結果をもとにした緑内障重症例の判定方法を検討した。すなわち、視野進行速度 (HFA, MD slope)、HFA 検査の Aulhorn 分類 Greve 変法病期、GP 検査の湖崎分類病期、HFA 緑内障進行判定プログラム (GPA) による検討などを行った。

さらに再現性取得実験用の症例収集を行い、広義 POAG 200 例を追加することにより、サブクラス解析を狭義 POAG・NTG ともに多数例で解析が行えるようにする。緑内障病型の診断には複数の熟練した緑内障専門医があたり、緑内障重症例の判定方法をもとに対象を 2 群に大別したが、左右眼ではより重症な眼を採用することとした。

2). ケース・コントロール相関解析

全ゲノム解析から取得したジェノタイプ生データを専用サーバーに注入後、緑内障重症例の判定方法別の各 SNP のジェノタイプの頻度計算を実施した。その後、コールレートやマイナーアレル頻度 (minor allele frequency, MAF) の厳格なフィルターを設定し、高品質なデータを抽出した。抽出されたデータについて、ジェノタイプおよびアレル頻度に基づくカイ二乗検定を行い、P 値を算出し、ケース群で有意な SNP の同定を試みた。同定された上位の SNP については、Hardy 法則への適合を検証すると共に、全てのジェノタイプのクラスター画像をチェックし、クラスター不良のデータは排除した。全てのフィルターをクリアした SNP については、その SNP 周辺の染色体情報 (遺伝子の有無や連鎖不平衡ブロック) を UCSC のゲノムブラウザ (<http://genome.ucsc.edu/>) を用いて解析する。500K および 1000K の結果はメタ解析を行って最終的な候補遺伝子バリエーションを確定することとした。

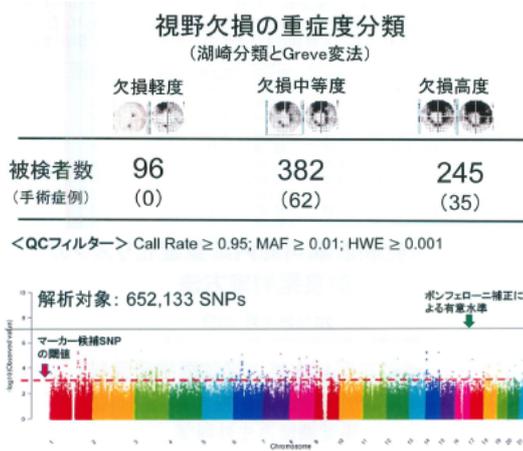
4. 研究成果

我々が定期的に経過観察を行っている全広義 POAG 患者の視野検査結果をもとにした緑内障重症例の判定方法を検討した。すなわち、以下のような視野進行速度 (HFA, MD slope)、HFA 検査の Aulhorn 分類 Greve 変法病期、GP 検査の湖崎分類病期、HFA 緑内障進行判定プログラム (GPA) による検討などを行った。1) 3 回以上の HFA 結果から作成した MD slope をもとに、視野進行速度の中間値を求め、前後 5% の症例を除いて進行速度の速い群と遅い群に分離する方法 (MD slope 法)、2) HFA 検査の視野障害程度による分類 (HFA 障害程度法)、3) GP 検査の視野障害程度による分類 (GP 障害程度法)、4) HFA 検査の Aulhorn 分類 Greve 変法の病期が 1 段階進行するまでの期間によって生存曲線を作成し、その中間値をもとに前後 5% の症例を除いて進行速度の速い群と遅い群に分離する方法 (HFA 病期生存曲線法)、5) GP 検査の湖崎分類病期が 1 段階進行するまでの期間による方法 (GP 病期生存曲線法)、6) GPA による進行判定を死亡と定義した生存曲線による方法 (GPA 法)。

緑内障重症例の判定方法別ゲノムワイド関連解析

1) 障害高度群 vs 障害軽度群

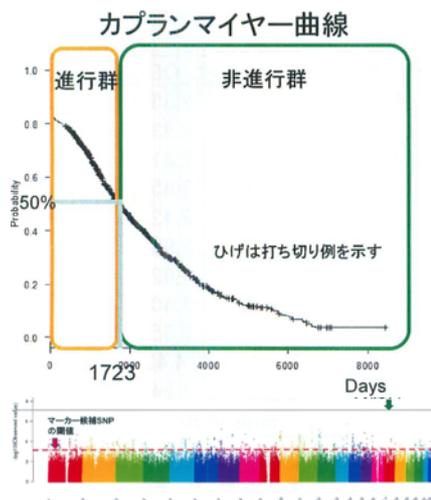
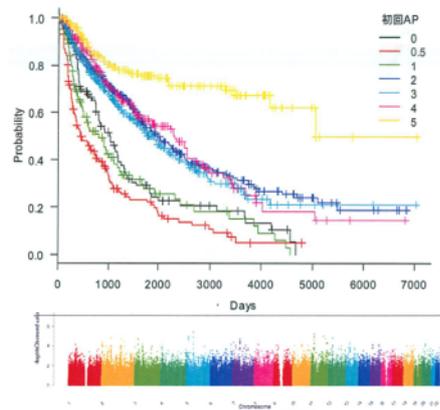
HFA 検査と GP 結果の視野障害程度により、欠損軽度、中等度、高度に分類し。軽度群 96 例と高度群 245 例の間で SNP によるゲノムワイド関連解析を行った結果を図に示す。複数のマーカー候補 SNP を抽出することができ、そのうちの上位のものを表に示す。



AL_X2P	AL_ODDS	DM_X2P	DM_ODDS	RC_X2P	RC_ODDS
1.4E-06*	-	1.0E+00	2.54	1.2E-06*	-
4.3E-06	2.56	5.7E-05	12.57	1.6E-04	2.55
5.2E-06	2.37	7.6E-05	7.73	1.3E-04	2.54
5.2E-06	2.36	6.3E-06	8.13	6.4E-04	2.29
5.9E-06	2.21	2.5E-03	2.76	4.5E-05	2.82
7.5E-06	2.20	6.2E-06	3.10	7.7E-03	2.44
8.6E-06	2.96	5.8E-03	18.08	2.9E-05	3.12
1.4E-05	3.31	2.3E-02	12.99	3.5E-05	3.44
1.8E-05	3.32	5.4E-03	18.38	1.2E-04	3.24
1.8E-05	2.16	5.5E-05	2.70	5.2E-03	2.81
1.9E-05	2.09	2.7E-06	3.70	1.0E-02	2.11
2.2E-05*	-	1.0E+00	2.54	1.9E-05*	-
1.0E-04	1.94	7.6E-03	2.13	5.1E-04	2.62
1.2E-04	2.96	6.6E-05	3.31	1.6E-01	4.47
5.1E-04	2.51	1.5E-04	2.99	5.3E-01	1.98
9.0E-04	1.86	6.0E-05	2.65	4.4E-01	1.33
4.4E-04	2.65	1.9E-04	3.01	2.8E-01	2.79
5.1E-04	2.51	1.5E-04	2.99	5.3E-01	1.98

2) HFA 病期生存曲線法

HFA 検査の Aulhorn 分類 Greve 変法の病期が 1 段階進行するまでの期間によって生存曲線を作成し、その中央値をもとに前後 5%の症例を除いて進行速度の速い群と遅い群に分離する方法によるゲノムワイド関連解析結果を図に示す。



3) GPA 法

GPA による進行判定を死亡と定義し、緑内障手術症例を加えた複合判定によるものと GPA 単独判定によるものを比較した。

本研究から得られた成果と今後の課題

同定した SNP を各重症化判定法別で比較したところ、重症化判定方法の組合せによってはボンフェローニ補正を超える SNP を複数見つけ出すことができたが、重症化判定の組合せ次第で原因となる候補 SNP が異なるのみならず、その方向性まで変わりうるということが明らかとなった。SNP の方向性が変わってしまった原因としては検体数不足による統計的パワー不足がもっとも考えられ、さらなる検体の収集による検出力増強が必要となるが、長期にわたる臨床データとゲノム情報の統合が必要であるといえる。

一方、近年、緑内障ポリジェネティックリスク・スコア (PRS) を用いることにより緑内障リスクを層別化することが可能であることが報告⁶⁾され、緑内障の進行予測にも用いられる可能性が指摘されている、今回得られたようなデータの組合せにより、PRS と同様、緑内障進行をゲノムデータから予測することが可能となる。今後、症例数増加による検出力の増強とともに重症化 SNP の至適な組合せ方法を検討してゆく必要があると考えられた。

6) Craig, JE, et al. Multitrait analysis of glaucoma identifies new risk loci and enables polygenic prediction of disease susceptibility and progression. *Nature genetics* 52, 160-166 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田代 啓 (Tashi ro Kei) (10263097)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	中野 正和 (Nakano Masakazu) (70381944)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	池田 陽子 (Ikeda Yoko) (00433243)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師 (24303)	
研究分担者	上野 盛夫 (Ueno Morio) (40426531)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	佐藤 隆一 (Sato Ryuichi) (30717533)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	吉井 健悟 (Yoshii Kengo) (90388471)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今井 浩二郎 (Imai Kojiro) (70728443)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師 (24303)	
研究分担者	外園 千恵 (Sotozono Chie) (30216585)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授 (24303)	
研究分担者	木下 茂 (Kinoshita Shigeru) (30116024)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関