

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09453

研究課題名(和文) 網膜格子状変性を対象とした分子遺伝学的発症機序の解明

研究課題名(英文) Genome-wide association study of lattice degeneration of the retina

研究代表者

上本 理世 (UEMOTO, Riyo)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：40384044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：網膜格子状変性とは、網膜周辺部の変性のことであり、特徴として、限局性網膜菲薄化、隣接硝子体ゲルの液化、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。網膜格子状変性では、後部硝子体剥離形成時に強く網膜を牽引しているため、網膜裂孔や網膜剥離を生じることもある。網膜格子状変性の発症には遺伝要因と環境要因が複合的に関与していることが示唆されている。本研究では、網膜格子状変性の遺伝要因を同定するため、日本人集団を対象とした網膜格子状変性のゲノムワイド関連解析を実行した。その結果、網膜格子状変性と相関を示す複数の疾患感受性遺伝子領域を同定し、網膜格子状変性の発症に関与するパスウェイを複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、網膜格子状変性の発症メカニズムの全容解明の一助となることが期待される。網膜格子状変性の発症メカニズムが解明されれば、特定された遺伝子またはパスウェイを対象とした新規治療薬(モノクローナル抗体、標的分子結合ペプチド、酵素阻害剤など)の開発も可能になり、その医学的意義は非常に高いと考えられる。また、本研究で特定される遺伝子およびパスウェイは網膜格子状変性のバイオマーカーとなる可能性があり、疾患の早期診断・早期治療といった臨床医学への応用に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Lattice degeneration of the retina is a vitreoretinal disorder characterized by focal retinal thinning associated with liquefaction of the overlying vitreous gel, and firm vitreoretinal adherence to lesion margins. After posterior vitreous detachment, vitreous traction at sites of substantial vitreoretinal adhesion often leads to retinal detachment. Lattice degeneration of the retina is currently thought to be triggered by various genetic and environmental factors. In this study, we performed a genome-wide association study of lattice degeneration of the retina using a Japanese population to clarify genetic factors of the disease. This study identified several susceptibility loci, which were significantly associated with lattice degeneration of the retina, and also identified some pathogenic pathways in lattice degeneration of the retina.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜格子状変性 ゲノムワイド関連解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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。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。

(2) 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)が約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。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、その発症頻度に民族間差が見られず、全人口の1割程度が罹患していると考えられている。

(3) 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網膜格子状変性の罹患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、あるいは疾患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) 網膜格子状変性は複数の遺伝要因(疾患感受性遺伝子)と環境要因が複合的に関与して発症する多因子性遺伝疾患であると考えられている。しかしながら、網膜格子状変性の発症に関与する疾患感受性遺伝子に関する既報は非常に少なく、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。

(5) したがって、本研究では、網膜格子状変性を対象にゲノム全域を網羅する遺伝子解析を実行し、網膜格子状変性の発症に関与する疾患感受性遺伝子および発症パスウェイの同定を試みた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、網膜格子状変性の発症リスクに関与する疾患感受性遺伝子を網羅的に同定することである。

(2) さらに、本研究では、網羅的に同定した網膜格子状変性の疾患感受性遺伝子を対象にパスウェイ解析を実行し、網膜格子状変性の発症に関与するパスウェイ(生物学的過程・経路)を特定し、網膜格子状変性の発症メカニズムおよび病態の解明を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 日本人網膜格子状変性患者510例および日本人健常者1,586例を対象に、ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)を実行した。本研究におけるGWASジェノタイピングは、ゲノム全域をカバーする約73万個のSNPs(single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型)が設定されたHumanOmniExpress BeadChipマイクロアレイ(イルミナ社)を用いて行った。GWASジェノタイピングの実験法はイルミナ社のプロトコールに準拠し、iScanシステム(イルミナ社)を用いてHumanOmniExpress BeadChipマイクロアレイのスキャンを系統的に実行した。

(2) (1)のGWASジェノタイピングにおいて取得したSNPデータを対象にimputation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ゲノム全領域のより詳細で高密度なSNP情報(Imputed GWASデータ)を取得した。本imputation解析では、Michigan Imputation Server(Das S, et al. Next-generation genotype imputation service and methods. Nat Genet. 2016;48(10):1284-1287. <https://imputationserver.sph.umich.edu>)を使用し、imputationのリファレンスデータとして、1000人ゲノムプロジェクト(1000 Genomes Project Consortium, et al. A global reference for human genetic variation. Nature. 2015;526(7571):68-74. <http://www.1000genomes.org/>)の東アジア人集団のデータ(Phase 3データセット)を使用した。

(3) (2)のimputation解析で取得したSNP(Imputed GWASデータ)について、患者・健常者間

の関連解析を実行し、網膜格子状変性におけるゲノム全域に渡る SNP との相関パターンを取得した。患者・健常者間の関連解析では、SNP & Variation Suite ソフトウェア (Golden Helix 社) を使用した。

(4) 私たちのグループは日本人集団 300 例を対象としたゲノム全域を対象とした遺伝子発現データ (whole-genome expression (WGE) データ) を保有している (論文未発表データ)。本研究では、「Imputed GWAS データ」と「WGE データ」を結合し、網膜格子状変性と有意に相関する SNP の総合的評価を実行した。本解析により、遺伝子の発現量に影響を与えることで網膜格子状変性の発症に関与するものの、網膜格子状変性の発症リスクに対する遺伝的効果が低いために通常の解析では同定できない SNP の効果的な同定が可能である。

(5) (4)までの解析において網羅的に同定された網膜格子状変性の疾患感受性遺伝子を対象にパスウェイ解析を実行し、網膜格子状変性の発症に関与するパスウェイ (生物学的過程・経路) の特定を行った。本パスウェイ解析では、KEGG や Reactome を含む 32 種類の公開データベースの情報を統合した「ConsensusPathDB」オンラインデータベース (Kamburov A, et al. Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):D793-800. <http://cpdb.molgen.mpg.de/>) を使用して実行した。

(6) (5)までの解析において同定された網膜格子状変性の疾患感受性遺伝子および発症パスウェイを対象に、新たな日本人集団 (網膜格子状変性患者 300 例、健常者 1,200 例) を用いて追認試験 (Replication study: 再現性の検討) を行い、網膜格子状変性と真に相関する疾患感受性遺伝子および発症パスウェイを同定した。本解析では、TaqMan アッセイを用いて候補 SNP のジェノタイピングを行った。TaqMan アッセイは Thermo Fischer Scientific 社のプロトコールに準拠した。

(7) 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、研究の目的、研究の期間と方法、研究参加により予測される効果及び危険性、研究に協力しない場合であっても不利益を受けないこと、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研究に参加していただいた。血液検体提供者の個人情報には連結匿名化の上、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。

(8) 本研究に参加するすべての検体提供施設は、各々の施設の倫理委員会より本遺伝子研究への参加を承認されている。

#### 4. 研究成果

(1) 日本人集団 (網膜格子状変性患者 510 例、健常者 1,586 例) について約 73 万個の SNPs を対象とした GWAS ジェノタイピングを実行し、GWAS の Quality control 基準 (Call rate > 98.0%、マイナーアレル頻度 > 1.0%、ハーディーワインバーグ平衡 P 値 > 0.00001) をすべてクリアする約 50 万個の SNPs の遺伝子型情報 (GWAS データ) を取得した。

(2) GWAS の Quality control 基準をクリアした約 50 万個の SNPs の遺伝子型情報 (GWAS データ) を用いて imputation 解析を行った結果、imputation 解析の Quality control 基準 (マイナーアレル頻度 > 1.0%、R-squared > 0.70) をクリアするゲノム全域を高密度に網羅する約 500 万個の SNPs データ (Imputed GWAS データ) を取得した。

(3) imputation 解析で網羅的に遺伝子型情報を取得した約 500 万個の SNPs について、網膜格子状変性患者群と健常者群間の関連解析を実行し、網膜格子状変性と約 500 万個の SNPs の相関性をゲノム全域に渡って見出した。さらに、網膜格子状変性とゲノムワイドレベルの有意水準 (genome-wide significant level:  $P < 5.0 \times 10^{-8}$ ) で顕著な相関を示す SNP を網羅的に同定した。

(4) Imputed GWAS データと WGE データを結合して、網膜格子状変性と相関する疾患感受性候補 SNP の総合的な評価を実行し、遺伝子の発現量に影響を与えることで網膜格子状変性の発症に関与する SNP についても網羅的に同定した。

(5) さらに、(3)と(4)において網羅的に同定した SNP および疾患感受性遺伝子を対象にパスウェイ解析を実行し、網膜格子状変性の発症に関与するパスウェイ (生物学的過程・経路) を複数見出した。

(6) (5)までに網羅的に同定した「SNP」、「遺伝子発現の変化」および「発症パスウェイ」を対象に、新たな日本人集団 (網膜格子状変性患者 300 例、健常者 1,200 例) を用いて追認試験を実

行し、網膜格子状変性と真に有意に相関する「SNP（疾患感受性遺伝子）」、「遺伝子発現の変化」および「発症パスウェイ（生物学的過程・経路）」を同定した。

(7) 本研究で同定された網膜格子状変性の疾患感受性遺伝子および発症パスウェイの情報は網膜格子状変性の発症メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。網膜格子状変性の発症メカニズムが解明されれば、特定された疾患感受性遺伝子または発症パスウェイを対象とした新規治療薬（モノクローナル抗体、標的分子結合ペプチド、酵素阻害剤など）の開発も可能になり、その医学的意義は非常に高いと考えられる。また、本研究の遺伝情報は網膜格子状変性のバイオマーカーとなる可能性があり、疾患の早期診断・早期治療といった臨床医学への応用に繋がることが期待される。

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	目黒 明  (Meguro Akira)  (60508802)	横浜市立大学・医学研究科・特任准教授   (22701)	
研究分担者	水木 信久  (Mizuki Nobuhisa)  (90336579)	横浜市立大学・医学研究科・教授   (22701)	

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			
トルコ	Acibadem大学			