

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09927

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた新規緑内障原因遺伝子の検索

研究課題名(英文) Investigation for new glaucoma gene using the next-generation sequencer

研究代表者

布施 昇男 (FUSE, NOBUO)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：10302134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：20家系以上の成人発症緑内障に対し、全エクソン解析を行った。アミノ酸変異、遺伝様式で絞り込みを行い、候補遺伝子を抽出した。筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子でもあるOPTN遺伝子のV161M変異を1家系で認めた。先天緑内障29家系31人について全エクソン解析を施行した。CYP1B1遺伝子異常(4新規変異含)9家系10人、3種の新規FOXC1遺伝子変異3家系4人に認めた。30%はCYP1B1遺伝子、10%はFOXC1遺伝子の異常であることを示した。緑内障の発症のリスクである眼軸長関連遺伝子のゲノムワイド関連解析GWASを行い、31個の遺伝子座を特定し、緑内障解析の基礎的データを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障に関しては、種々の発症機序による層別化がまだ行われておらず、緑内障として一連の疾患群とされている状態である。緑内障は、低頻度の多型と高頻度の多型が原因となる不均一な疾患であると考えられるが、国内外ともに網羅的な解析は進んでいないのが現状である。緑内障の発症に効果が大きい低頻度の多型解析を、全エクソン解析により進めること、また緑内障の発症のリスクである因子を検索することにより、高頻度の多型だけでは説明できない遺伝力の欠損問題が解明できると期待される。今後の個別化医療に、日本人における緑内障の原因遺伝子の同定、抽出と、緑内障発症のリスク因子との関連解析は大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：(1) Whole exome analysis was performed for adult-onset glaucoma of 20 families or more. Candidate genes were extracted by amino acid substitution and mode of inheritance. A V161M mutation in the OPTN gene, which is also the causative gene for amyotrophic lateral sclerosis, was found in one family. (2) Whole exome analysis was performed on 31 people from 29 families with congenital glaucoma. CYP1B1 gene abnormality (including 4 new mutations) was observed in 10 patients in 9 families and 3 new FOXC1 gene mutations in 4 patients in 3 families. 30% showed abnormalities in the CYP1B1 gene and 10% showed abnormalities in the FOXC1 gene. (3) Genome-wide association study of genes related to axial length, which is a risk of developing glaucoma, was performed. 31 loci were identified and basic data for glaucoma analysis were constructed.

研究分野：眼科

キーワード：緑内障 次世代シーケンサー 全エクソン解析 原因遺伝子探索 ゲノムワイド関連解析

1. 研究開始当初の背景

近年、一塩基多型 (SNP)、欠失、挿入のゲノムデータベースは急速に充実し、データから知識、知識から個別化医療に向けてのインフラストラクチャーが整ってきている。失明原因の第一位である緑内障は、多数の遺伝子と環境因子がからむ疾患であり、いまだ原因遺伝子の解明は途上である。

現在我が国における緑内障有病率 (40 歳以上) は約 5% とされ、人口から概算して緑内障の潜在患者数は約 360 万人にもものぼると推定される。その有病率は、40 歳代では 2% であるが 70 歳代になると 10% を越え年齢とともに上昇する。以前より、緑内障には家族歴が関係するとされている。外来にても家族歴を有する症例に遭遇する頻度は約 1 割程度あり、希少変異である緑内障原因遺伝子やそれよりも頻度の高い感受性遺伝子が存在することが強く示唆され、開放隅角緑内障の原因遺伝子、遺伝子多型は (1) 単一遺伝子異常、(2) 高頻度の遺伝子多型、(3) 低頻度の遺伝子多型に大きく分類される。

(1) 単一遺伝子異常: 現在まで、**GLC1A** から **GLC1Q** まで 17 の遺伝子座がマッピングされ、**MYOC (GLC1A)**、**OPTN (GLC1E)** 遺伝子などが同定されている。これらの原因遺伝子は、メンデルの法則に基づく遺伝形式を示す大きな家系において、発見されたものであり、我々も追試を行い、新たな遺伝子変異、家系を報告してきた (**Fuse N, et al. J Glaucoma 2004, Mol Vis. 2008**)。

(2) 高頻度の遺伝子多型関連の緑内障: 2009 年日本人において **GWAS** により候補遺伝子が抽出され、我々も関連解析にて正常眼圧緑内障に関連する **HK2**、**NCK2** 遺伝子 (**Shi D, Fuse N, et al. PLoS ONE 2013**) を報告した。また、**CDKN2B-AS1**、**SIX6**、**GAS7** 遺伝子の SNP の関連 (**Shiga Y, Fuse N, et al. PLoS One 2017**)、新規の 7 遺伝子座の関連の報告を行った (**Shiga Y, Fuse N, et al. Hum Mol Genet. 2018**)。しかし、これらの遺伝子多型はアリル頻度が 0.1 以上のオッズ比が 1.2 程度と効果サイズが小さい SNP であり、緑内障診断、罹患予測に使えるレベルにはまだ至っていない。

(3) 低頻度の遺伝子多型関連の緑内障: **GWAS** で検出される遺伝子多型は、一般的にオッズ比が 1.5 以下と効果サイズが小さく、より効果サイズの大きいと考えられる低頻度の遺伝子多型解析が必須であると考えられる。しかし、国内外において低頻度の緑内障の遺伝子多型解析はいまだ解析途上である。

緑内障においては視野の特徴的な欠損を示すが、これに先んじて視神経節細胞層の非薄化が見られる。発症初期においてはこの変化がなかなか捉えにくく、臨床的に緑内障かどうかを診断するのが困難な例では、遺伝子診断が非常に効果を発揮することになると考えられる。また、遺伝子型による分類が可能になれば、特異的な予後予測、治療が行われる可能性が考えられる。予想される結果としては、全エクソン解析により日本人の開放隅角緑内障、発達緑内障に関与している遺伝子が明らかになり、欧米の原因とは違う病因を明らかにできる可能性がある。

2. 研究の目的

家系を用いた遺伝子解析と、組織型との関連解析の 2 点から、緑内障の原因遺伝子の解明を進める。具体的には (1) 緑内障家系における全エクソン解析から、緑内障の原因候補遺伝子の抽出、原因遺伝子の同定 (2) 遺伝子異常 - 組織、表現型の関連解析から、緑内障の病

態解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 緑内障原因遺伝子同定のための全エクソン解析

成人発症緑内障家系サンプルを収集し、ゲノム DNA を濃縮し、ライブラリ調整を行う。試料は、次世代シーケンサー **HiSeq2500** (**Illumina** 社) を用いて、全エクソン解析を参照ゲノムには我々解析した日本人全ゲノム参照パネル (**Fuse, et al. Nature communications 2015**) を用いる。アミノ酸変異を伴うもの、遺伝様式に基づく絞り込みを行い、候補遺伝子を抽出する。遺伝子の機能の観点から、緑内障の原因候補遺伝子となりうるか、**GWAS** によって報告されている関連遺伝子がないかどうか検討を行う。) 緑内障遺伝子と表現型、組織型の関連を明らかにする

(2) 先天緑内障における全エクソン解析

発達緑内障早発型は通常家族歴がみられず、遺伝形式が常染色体劣性形式もしくは弧発型と考えられる。今回、**27** 家系 **36** 症例を収集し、全家系について全エクソン解析を行う。既知の原因である **CYP11B1** 遺伝子変異、**FOXC1** 遺伝子変異の確認と、新規の原因遺伝子検索を行う。

(3) 緑内障遺伝子と表現型、組織型の関連解析

緑内障原因遺伝子として確立されている **MYOC** 異常を有する緑内障 (**MYOC** 緑内障) と有さない家族性緑内障 (非 **MYOC** 緑内障) の隅角組織の相違を検討する。

4. 研究成果

緑内障家系 (成人発症の緑内障、先天緑内障) における全エクソン解析から、日本人における緑内障の原因遺伝子の同定、原因候補遺伝子の抽出を試みた。

(1) 緑内障原因遺伝子同定のための全エクソン解析: **20** 家系以上の成人発症緑内障家系サンプルを収集ゲノム DNA を濃縮し、ライブラリ調整を行い、次世代シーケンサー **HiSeq2500** (**Illumina** 社) を用いて、全エクソン解析を行った。アミノ酸変異を伴うもの、遺伝様式に基づく絞り込みを行い、候補遺伝子を抽出した。一家系で、筋萎縮性側索硬化症 (**ALS**) の原因遺伝子でもある **OPTN** 遺伝子の **V161M** 変異を **1** 家系で認めた。

(2) 先天緑内障における全エクソン解析: 発達緑内障早発型は通常家族歴がみられず、遺伝形式が常染色体劣性形式もしくは弧発型と考えられる。現在まで収集した **29** 家系 **31** 人について全エクソン解析を施行した。その結果、**CYP11B1** 遺伝子異常を **9** 家系 **10** 人に認めた。**p.A202T**, **p.D274E**, **p.Q340X**, **p.V420G** は新規の変異であった。また **3** 家系 **4** 人において **FOXC1** 遺伝子に、**3** 種の新規遺伝子変異を認めた。これらから日本人の先天緑内障において **30%** は **CYP11B1** 遺伝子異常、**10%** は **FOXC1** 遺伝子異常であることを明らかとし、先天緑内障の原因探索に有用であることが示された。

(3) 近視は、緑内障の発症のリスクと報告されたおり、近視の主な原因である眼軸長の伸長にかかわる遺伝子のゲノムワイド関連解析 **GWAS** を行った。地域住民コホート調査参加者 **22,379** 人および三世代コホート調査参加者の成人 **11,104** 人の計 **33,483** 人を対象とした。眼軸長は、身長、就学歴の長さ、家族歴、眼圧と正の相関があったが、年齢は負の相関を示した。**GWAS** では、メタ解析の結果、眼軸長に関連する **31** 個の遺伝子座を特定し、緑内障解析の基礎的データを構築した。

また、線維柱帯切除術を行い、かつ **MYOC** 異常を持つ **MYOC** 緑内障症例と非 **MYOC**

緑内障症例に対し、隅角組織を光学顕微鏡もしくは透過型電子顕微鏡で観察した。線維柱帯の厚さが数倍に膨化していること、線維柱帯細胞の顕著な変性もしくは欠落を認め、間隙にはスペースはほとんど無いことが追試できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fuse N, Sakurai M, Motoike IN., Kojima K, Takai-Igarashi T, et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Genome-wide Association Study of Axial Length in Population-based Cohorts in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmology Science	6. 最初と最後の頁 100113 ~ 100113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xops.2022.100113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------