

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592221

研究課題名（和文）原発開放隅角緑内障感受性遺伝子の検索-ESR2遺伝子多型解析-

研究課題名（英文）Investigation of susceptibility genes for primary open-angle glaucoma - Analysis of ESR2 gene polymorphisms -

研究代表者

間渕 文彦 (MABUCHI FUMIHIKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：20322125

研究成果の概要（和文）：女性原発開放隅角緑内障（POAG）、非緑内障コントロール症例を対象に、エストロゲン受容体β（ESR2）遺伝子全領域について多型解析を行い、新たに眼圧との関連を認める ESR2 遺伝子多型を同定した。これは、本遺伝子多型が女性における眼圧制御、POAG の眼圧上昇に関与していることを強く示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：Single nucleotide polymorphisms (SNPs) covering the whole region of estrogen receptor beta (ESR2) gene were genotyped in female patients with primary open-angle glaucoma (POAG) and the control subjects without glaucoma, and novel SNPs associated with intraocular pressure (IOP) were identified. These results strongly suggest that the ESR2 gene polymorphisms are associated with IOP regulation in women and IOP elevation in female patients with POAG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：緑内障 estrogen receptor beta ESR2 遺伝学 眼圧 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、視神経の脱落により高度の視機能障害を来す疾患であり、臨床的には、特徴的な視神経乳頭の陥凹拡大と視神経線維欠損、視野検査にて視神経線維欠損部位に一致した視野狭窄を認め、末期には視力低下も伴う。我が国の失明原因の第1位に位置し、推定患者人口は400万人、有病率は40歳以上で5.0%と報告されている。緑内障の中で最も頻度が高い原発開放隅角緑内障（POAG）の発症、進行の原因としては、虚血、視神経の軸索輸送障害、過剰なグルタミン酸など、様々な要因が関与した多因子疾患と考えられているが、中

でも高眼圧は最も重要な危険因子と考えられ、現在の臨床の場においては、眼圧下降が唯一確立された治療手段といっても過言ではない。しかし、眼圧上昇のメカニズムについては、未だそのほとんどが解明されていないのが現状である。POAG発症に関与する遺伝要因の検索としては、これまで約20のPOAG原因遺伝子座位が報告されており、これら遺伝子座位のうち myocilin (MYOC), optineurin (OPTN), WD40-repeat 36 (WDR36) 遺伝子変異が同定されている。POAG感受性遺伝子多型については、optic atrophy 1 (OPA1) など約30の報告があるが、これら検索は未

だ不十分であり、未知の感受性遺伝子が数多く存在していると考えられる。これら遺伝子の中で、眼圧上昇への関与が明らかなものとして *MYOC* が挙げられるが、*MYOC* 遺伝子変異による緑内障発症の頻度は、POAG 全体の約 2-4%程度と少なく、他の遺伝子変異または多型が眼圧上昇に関与していると考えられる。しかし、それら遺伝子の同定には至っておらず、眼圧上昇の原因を解明し、遺伝子治療を含む新しい治療法を確立するためにも、更なる検索が必要不可欠である。Estrogen は、受容体と複合体を形成して核内へ移動し、様々な遺伝子の転写を活性化する。これら受容体として、これまで estrogen receptor alpha (*ESR1*) と beta (*ESR2*) が知られており、全身の細胞内に存在しているが、眼内においても網膜神経節細胞や毛様体など、その存在が報告されている。また、早期に閉経した女性の方が POAG になるリスクが高いという報告や、閉経女性に estrogen を投与すると眼圧が下降したという報告があり、estrogen が POAG 発症、眼圧上昇に関与している可能性が示唆される。これまで我々は、POAG と遺伝子変異、遺伝子多型との関係を明らかにするため、日本人対象症例から血液サンプルを収集して検索を行い報告してきた。そして我々は、*ESR2* 遺伝子の 2 つの多型 (rs1256031, rs4986938) の頻度が女性 POAG 症例で高く、さらに rs1256031 遺伝子多型のリスクアリルを持っている程、眼圧が高いことをみいだした。しかし、眼圧との関連の認められた多型は 1 つのみであり、*ESR2* 遺伝子の眼圧制御、引いては POAG への関与を明らかにするためには、本遺伝子全領域について多型の検索を行う必要がある。

2. 研究の目的

ESR2 遺伝子の眼圧制御、POAG における眼圧上昇への関与を明らかにするため、本遺伝子全領域について多型解析を行うこと。

3. 研究の方法

(対象)

POAG: 典型的緑内障性視神経乳頭陥凹、静的自動視野計にて視神経乳頭変化に一致した緑内障性視野欠損を認め、隅角検査にて開放隅角かつ眼圧上昇の原因となるような他の眼疾患のない症例。最高眼圧が 20mmHg 以上の症例を高眼圧群、20mmHg 未満の症例を正常眼圧群と定義。

非緑内障コントロール: 40 歳以上、眼圧 21mmHg 以下で、正常視神経乳頭(視神経乳頭陥凹/視神経乳頭径比 0.4 以下で、乳頭辺縁リムの非薄化を伴わないもの)を呈し、緑内障家族歴がなく、POAG と関連のある眼疾患や視神経疾患のない症例と定義

(方法)

書面によるインフォームドコンセントにて同意の得られた症例より採血を行い、本研究の対象者とした。本研究は、すでに山梨大学倫理委員会(学長)の承認を得ている。採取した血液サンプルよりゲノム DNA を抽出し、*ESR2* 遺伝子のプロモーター領域から 3' UTR まで、エキソンだけでなくイントロンも含めた本遺伝子全領域から、マーカーに適していると考えられるタグ SNP (rs928554, rs4986938, rs944461, rs1256059, rs1256049, rs1273196, rs1256031, rs1256120)を選定し、allele specific primer PCR 法、allele specific primer real time PCR 法または TaqMan SNP genotyping assay を用いて遺伝子型を同定した。統計解析は、SAS statistical software (ver 9.1)を用い、得られた遺伝子型について Hardy-Weinberg 平衡検定を行い、データ精度に問題がないことを確認した。正常眼圧群、高眼圧群における検索 SNP の allele 頻度の違いを Fisher exact test にて解析し、各 SNP の正常眼圧-高眼圧群におけるオッズ比、95%信頼区間をロジスティック解析により算出した。また、検索 SNP 間の正常眼圧-高眼圧群による linkage disequilibrium を Haploview program (ver 4.2)にて解析。さらに、検索 SNP の各遺伝子型における最高眼圧を分散分析 (ANOVA) にて比較し、年齢、屈折、各 SNP の risk allele を独立変数、最高眼圧を従属変数として重回帰分析を施行した。

4. 研究成果

症例データを表 1 に示す。

表1 症例データ

	正常眼圧群 (眼圧 < 20 mmHg)	高眼圧群 (眼圧 ≥ 20 mmHg)	P値*	Total (n = 326)	
	(n = 190)	(n = 136)			
年齢 (才)	65.2 ± 12.4	66.2 ± 12.8	0.45	65.6 ± 12.5	
LogMAR矯正視力	良い方	-0.040 ± 0.16	-0.044 ± 0.20	0.84	-0.041 ± 0.18
	悪い方	-0.26 ± 0.48	-0.25 ± 0.57	0.82	-0.25 ± 0.52
屈折 (diopter)	-0.9 ± 2.7	-1.5 ± 3.0	0.063	-1.2 ± 2.8	
最高眼圧 (mmHg)	15.7 ± 2.5	24.6 ± 7.5	< 0.0001	19.4 ± 6.8	

連続変数は平均 ± 標準偏差 *Student t-test.

正常眼圧群と高眼圧群における rs928554, rs944461, rs1256059, rs1256031 の allele 頻度に有意差を認め、(表 2) rs928554 G allele, rs944461 T allele, rs1256059 T allele, rs1256031 C allele を持っている症例は、持っていない症例と比べ約 1.4-1.7 倍高眼圧になりやすかった。(表 3) これら allele 頻度に有意差を認めた 4 SNPs は高い連鎖不均衡にあり最も統計的有意であった rs1256031 と、有意差を認めなかった SNPs とは比較的低い連鎖不均衡にあった。(図 1) また、rs928554, rs1256059, rs1256031 の遺伝子型により最高眼圧に有意差を認め、rs928554 G allele, rs1256059 T allele, rs1256031 C allele を持っている症例程、最

高眼圧が高かった。(図2) これら最高眼圧との関連が認められた3 SNPs は、重回帰分析においても同様に眼圧との関連を認めた。(表4)

表2 ESR2遺伝子多型の正常眼圧群, 高眼圧群におけるallele頻度の比較

遺伝子多型 (rs #)	Position (bp)	Minor Allele	Minor allele頻度 (%)		P値*
			正常眼圧群 (眼圧 < 20 mmHg) (n = 190)	高眼圧群 (眼圧 ≥ 20 mmHg) (n = 136)	
rs928554	64694195	G	36.3	46.3	0.012
rs4986938	64699816	A	16.6	12.5	0.18
rs944461	64705140	C	32.1	23.9	0.023
rs1256059	64710417	T	37.1	47.1	0.012
rs1256049	64724051	A	31.3	25.0	0.080
rs1273196	64739505	C	38.2	33.5	0.25
rs1256031	64746179	C	42.6	56.3	0.0006
rs1256120	64805001	C	38.4	33.8	0.25

ESR2: estrogen receptor beta, * Fisher's exact test.

表3 女性正常眼圧 - 高眼圧群におけるロジスティック解析

変数	P値	オッズ比 (95%信頼区間)
年齢 (才)	0.10 - 0.13	1.02 (0.99 to 1.04)
屈折 (dioptr)	0.021 - 0.049	0.90 - 0.92 (0.83 to 0.99)
ESR2遺伝子多型		
rs928554 G allele	0.028	1.43 (1.04 to 1.95)
rs4986938 G allele	0.23	1.33 (0.84 to 2.09)
rs944461 T allele	0.031	1.50 (1.04 to 2.17)
rs1256059 T allele	0.025	1.44 (1.05 to 1.99)
rs1256049 G allele	0.098	1.37 (0.94 to 1.98)
rs1273196 T allele	0.25	1.21 (0.87 to 1.68)
rs1256031 C allele	0.0019	1.67 (1.21 to 2.30)
rs1256120 T allele	0.28	1.20 (0.87 to 1.66)

ESR2: estrogen receptor beta.

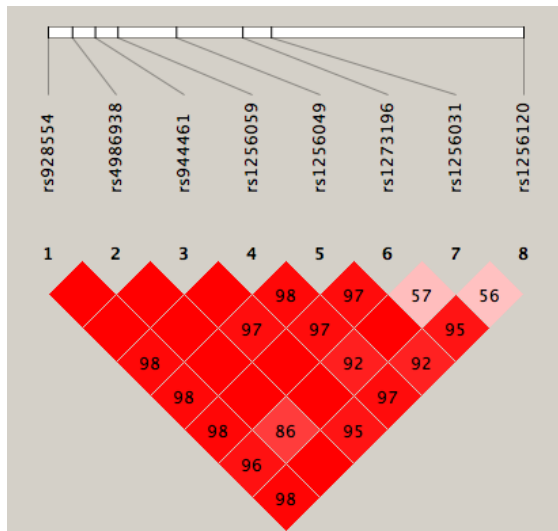
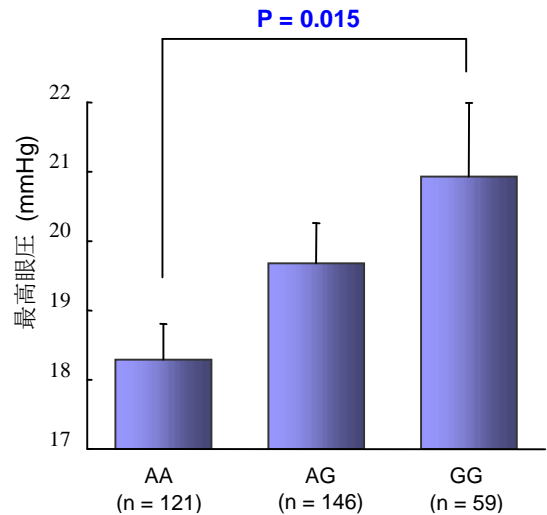
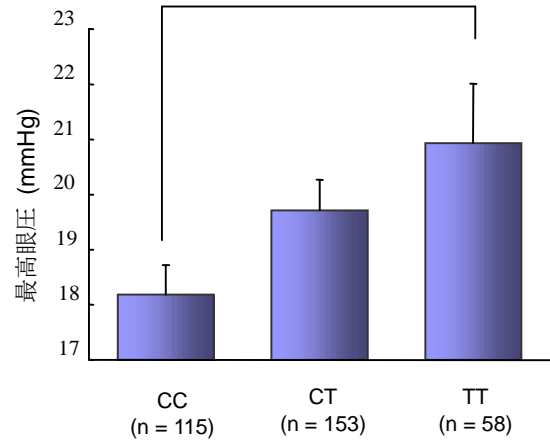


図1 HaploView programによるESR2遺伝子多型の連鎖不均衡の解析

正常眼圧群と高眼圧群のallele頻度に有意差を認めた4 SNPs (rs928554, rs944461, rs1256059, rs1256031) は高い連鎖不均衡にあった。また、最も統計的有意であったrs1256031と、allele頻度に有意傾向を認めなかったSNPs (rs4986938, rs1273196, rs1256120) とは比較的低い連鎖不均衡にあった。

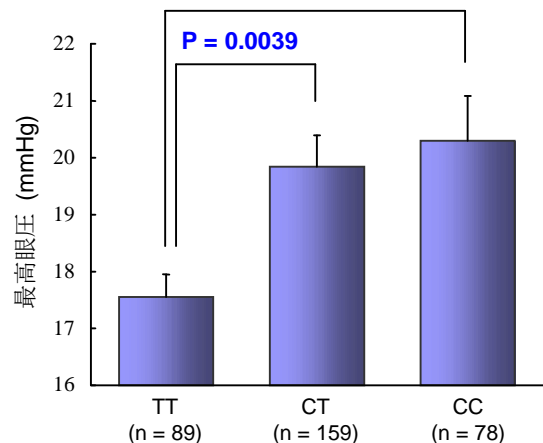


rs928554遺伝子型
P = 0.012



rs1256059遺伝子型

P = 0.0023



rs1256031遺伝子

図2 ESR2遺伝子多型における遺伝子型と最高眼圧の関係 rs928554, rs1256059, rs1256031において、各遺伝子型の最高眼圧に有意差(それぞれP = 0.040, P = 0.032, P = 0.0034 ANOVA)を認めた。

表4 最高眼圧を従属変数とした重回帰分析の結果

独立変数	Beta	SE	P値
年齢(才)	0.039 - 0.043	0.032	> 0.18
屈折(dioptor)	-0.53 - -0.57	0.14 - 0.15	² 0.0003
<i>ESR2</i> 遺伝子多型			
rs928554 G allele	1.06	0.52	0.042
rs4986938 G allele	0.48	0.73	0.51
rs944461 T allele	0.88	0.59	0.14
rs1256059 T allele	1.10	0.53	0.036
rs1256049 G allele	0.67	0.60	0.27
rs1273196 T allele	0.63	0.54	0.24
rs1256031 C allele	1.38	0.52	0.008
rs1256120 T allele	0.48	0.53	0.37

ESR2: estrogen receptor beta,

Beta : standardized regression coefficient,

SE: standard error, F値 = 5.5 - 7.9, P² 0.001.

以上より、rs1256031に加え、新たに眼圧との関連を認める *ESR2* 遺伝子多型 rs928554, rs1256059 を同定した。これは、*ESR2* 遺伝子多型が女性における眼圧制御、POAG 眼圧上昇に関与していることを強く示唆している。

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9件)

- ① Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Association between genetic variants associated with vertical cup-to-disc ratio and phenotypic features of primary open-angle glaucoma. *Ophthalmology*, 査読有, Vol.119, 2012, in press.
- ② Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Association between *SRBD1* and *ELOVL5* gene polymorphisms and primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有, Vol.52, 2011, 4626-4629. DOI:10.1167/iovs.11-7382
- ③ Sakurada Y, Kubota T, Imasawa M, Mabuchi F, Tateno Y, Tanabe N, Iijima H. Role of complement factor H I62V and age-related maculopathy susceptibility 2 A69S variants in the clinical expression of polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmology*, 査読有, Vol.118, 2011, 1402-1407.
- ④ Sakurada Y, Mabuchi F, Yoneyama S, Kubota T, Iijima H. Polymorphisms in *ARMS2 (LOC387715)* and *LOX1* Genes in the Japanese With Age-Related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol*, 査読有, Vol.152, 2011, 499.
- ⑤ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K,

Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Lack of association of common variants on chromosome 2p with primary open-angle glaucoma in the Japanese population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, Vol.107, 2010, E90-91.

- ⑥ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Estrogen receptor beta gene polymorphism and intraocular pressure elevation in female patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 査読有, Vol.149, 2010, 826-830 e1-2.
- ⑦ Writing committee for the normal tension glaucoma genetic study group of Japan glaucoma society. Genome-wide association study of normal tension glaucoma: common variants in *SRBD1* and *ELOVL5* contribute to disease susceptibility. *Ophthalmology*, 査読有, Vol.117, 2010, 1331-1338 e5.
- ⑧ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Lack of association between *p53* gene polymorphisms and primary open angle glaucoma in the Japanese population. *Mol Vis*, 査読有, Vol.15, 2009, 1045-1049.
- ⑨ Sakurada Y, Kubota T, Imasawa M, Tsumura T, Mabuchi F, Tanabe N, Iijima H. Angiographic lesion size associated with *LOC387715* A69S genotype in subfoveal polypoidal choroidal vasculopathy. *Retina*, 査読有, Vol.29, 2009, 1522-1526.

[学会発表] (計5件)

- ① 間渕文彦, 櫻田庸一, 柏木賢治, 山縣然太朗, 飯島裕幸, 塚原重雄 Estrogen receptor beta遺伝子多型と眼圧の関連について. 日本眼科学会 2012.4.6 東京
- ② Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. Gene polymorphisms associated with optic nerve vertical cup-to-disc ratio are risk factors for primary open angle glaucoma. Annual Meeting of American Society of Human Genetics 2011.10.14 Montreal
- ③ 間渕文彦, 櫻田庸一, 柏木賢治, 山縣然太朗, 飯島裕幸, 塚原重雄 垂直C/D比に関与する遺伝子多型と原発開放隅角緑内障との関連について. 日本緑内障学会 2011.9.24 秋田
- ④ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S. *SRBD1* gene polymorphism is associated with normal tension and high tension glaucoma. Annual Meeting of American

Society of Human Genetics 2010.11.5
Washington DC

- ⑤ Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K,
Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S.
Association of the *LOXL1* gene
polymorphism with exfoliation syndrome
after intraocular surgery. World
Glaucoma Congress 2009.7.9 Boston

[図書] (計2件)

- ① 間渕文彦, メディカル葵出版, あたらしい眼科 Q20 緑内障遺伝子検査は可能か, 2010. 232-234
② 間渕文彦, 中山書店, 眼科診療クオリファイ 原発開放隅角緑内障(狭義)の薬物治療, 2012. 209-212

[その他]

ホームページ等

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DisInfo.Scholar?ID=11CB59E63296DFFE

<http://sangaku.yamanashi.ac.jp/SearchResearcher/contents/11CB59E63296DFFE.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間渕 文彦 (MABUCHI FUMIHIKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：20322125

(2) 研究分担者

櫻田 庸一 (SAKURADA YOICHI)

山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90456476

柏木 賢治 (KASHIWAGI KENJI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：30194723

山縣 然太朗 (YAMAGATA ZENTARO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号：10210337

飯島 裕幸 (IIJIMA HIROYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号：80114362

(3) 連携研究者

なし