

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09747

研究課題名（和文）ゲノムデータに基づいた正常眼圧緑内障の発症パスウェイ解析

研究課題名（英文）Pathogenic pathway analysis in normal tension glaucoma using genome data

研究代表者

野村 英一（NOMURA, Eiichi）

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：00347303

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：正常眼圧緑内障（NTG）の発症には複数の遺伝要因が関与していると考えられている。近年の精力的な遺伝子解析研究により、NTGの遺伝要因（疾患感受性遺伝子）が多数同定されているものの、NTGの発症メカニズムや病態の全容は未だ解明されていない。本研究では、これまでに報告されている遺伝子解析結果の情報をもとに、NTGの発症パスウェイ解析を実行し、NTGの疾患感受性遺伝子が関与するNTGの発症機序を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NTGの発症パスウェイが見出されたことで、発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子（分子）を対象とした効果的な治療薬の開発が可能になり、NTGの進行予防・進行抑制に繋がることが期待される。具体的には、発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子のゲノム情報を基に、標的分子の機能を制御できる医薬分子の候補を網羅的にスクリーニングすることで、患者個々の遺伝要因に応じた治療薬（ゲノム創薬）の開発が可能になり、その臨床的意義は大きいといえる。

研究成果の概要（英文）：Genetic factors are thought to be involved in the pathogenesis of normal tension glaucoma (NTG). Although many susceptibility genes for NTG have been identified, the complete mechanisms of NTG pathogenesis remain to be elucidated. In this study, we performed a pathway analysis of NTG pathogenesis based on the information from genetic studies reported so far and found the pathogenic mechanism of NTG involving susceptibility genes of NTG.

研究分野：眼科学

キーワード：正常眼圧緑内障 疾患感受性遺伝子 パスウェイ解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障は神経節細胞のアポトーシスにより視神経が傷害される進行性の難治性疾患であり、放置すると視野狭窄が進行し、失明に至ることがある(中途失明原因の第1位)。緑内障の有病率は加齢と共に上昇し、40歳以上では約5.0%(20人に1人)が緑内障を罹患していると推定されており、本邦における緑内障潜在患者数は400万人以上ともいわれる(Iwase A, et al. Ophthalmology. 2004;111(9):1641-1648.)

(2) 緑内障には、眼圧が正常範囲にあるにも関わらず視野狭窄を来す正常眼圧緑内障(normal tension glaucoma: NTG)が存在し、本邦ではNTGが緑内障全体の約80%と高頻度に存在する。NTGは正常眼圧であるため、無症状のうちに病態が進行し、自覚症状が現れる頃にはかなり進行している場合が多い。緑内障では一度失った視機能は回復することはないため(不可逆性の変化であるため)、その治療の基本は進行予防・進行抑制であり、早期発見・早期治療での視神経障害の進行阻止が極めて重要である。しかしながら、NTGは眼圧が正常であるため、本人の自覚症状が乏しく、健康診断や通常の眼科の診察では見落とされることも少なくない。

(3) 緑内障は複数の遺伝的要因と環境要因が複合的に関与して発症する多因子疾患と考えられている。緑内障の遺伝子解析は以前より実施されており、家系検体を対象とした「連鎖解析(linkage analysis)」や特定の遺伝子を対象とした「候補遺伝子解析(candidate gene analysis)」に加え、近年では、ゲノム全域を対象とした遺伝子解析である「ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)」が精力的に行われ、緑内障の疾患感受性遺伝子が次々と報告されている。しかしながら、NTGを含めて緑内障の発症メカニズムや病態の全容は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

(1) これまでにNTGを含めて緑内障の発症に関与する疾患感受性遺伝子の候補が多数報告されているものの、これまでの研究の多くでは、各々の研究において同定された遺伝子が緑内障の発症にどのように関与するかを個別に推察・評価しているだけであり、緑内障の疾患感受性遺伝子について網羅的かつ多角的な評価は行われていない。緑内障が種々の遺伝的要因が複合的に関与して発症する多因子疾患であることを踏まえ、緑内障の発症メカニズムや病態の全容を解明する上では、疾患感受性遺伝子の網羅的かつ多角的な評価を実施することが必須であると考えられる。

(2) 本研究は、本邦に最も多い緑内障のタイプであるNTGを対象に、これまでに報告されているNTGの疾患感受性候補遺伝子のゲノム情報および統計学的情報を用いて、NTG発症パスウェイの網羅的な解析を実行し、NTGの発症に関与するパスウェイ(生物学的過程・経路)を同定することを目的とする。

(3) また同時に、NTGの疾患感受性遺伝子を対象とした機能解析も実行し、NTGの発症に関与するパスウェイの多角的な解明を行う。

3. 研究の方法

(1) これまでに報告されているNTGの疾患感受性遺伝子の網羅的な検索

以下の～の手順でこれまでに報告されているNTGの疾患感受性遺伝子の網羅的な検索を行った。

「PubMed」, 「Web of Science」, 「Scopus」, 「ScienceDirect」, 「Embase」, 「Google Scholar」のオンラインデータベースを用いて、これまでに報告されているNTGの疾患感受性遺伝子を網羅的に検索した。

データベース検索では、「normal tension glaucoma」, 「NTG」, 「low tension glaucoma」, または、「LTG」を疾患名の検索キーワードとして、「single nucleotide polymorphism(s)」, 「SNP(s)」, 「variant(s)」, 「variation(s)」, 「polymorphism(s)」, 「mutation(s)」, 「locus」, または、「loci」を遺伝子多型(変異)の検索キーワードとして、NTGの疾患感受性遺伝子の検索を実行した。

網羅的に検索したNTGの疾患感受性遺伝子を報告する各々の研究から、「解析サンプル数」, 「P値」, 「オッズ比」, 「95%信頼区間」, 「遺伝子多型のアリル頻度」の情報を抽出し、パスウェイ解析に用いた。

同一の疾患感受性遺伝子が複数の研究で報告されている場合は、各研究を結合したメタ解析を実行し、メタ解析における「解析サンプル数」, 「P値」, 「オッズ比」, 「95%信頼区間」も算

出した。

(2) NTG の疾患感受性遺伝子を対象としたパスウェイ解析

本解析では、研究協力施設であるトルコ・Acibadem 大学のグループが近年開発した手法(Ulgen E, et al. Front Genet. 2019;10:858.) を応用して、網羅的に検索・抽出した NTG の疾患感受性遺伝子を対象としたパスウェイ解析を実行し、NTG の発症と統計学的有意に相関を示すパスウェイの同定を行った。本パスウェイ解析では、各疾患感受性遺伝子の関連解析の情報・結果(解析サンプル数、P 値、オッズ比、95%信頼区間、遺伝子多型のアリル頻度)を解析パラメータとして用いた。

(3) 同定した NTG 発症パスウェイを対象とした遺伝子多型解析(追認試験)

本解析では、同定した NTG 発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子について、私達が保有する日本人集団においても、既報と同様に NTG の発症リスクと有意な相関を示すかを評価するため、NTG 発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子内の遺伝子多型・変異を対象に、日本人集団(NTG 患者 531 例、健常者 1,200 例)を用いて追認試験を実行した。本解析では、TaqMan アッセイを用いて遺伝子多型・変異のジェノタイピングを行い、NTG と疾患感受性遺伝子の相関性を検討した。

(4) NTG 発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子の機能解析

追認試験を行ったのち、同定した NTG 発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子を対象に、以下の ~ に示す機能解析を実行し、疾患感受性遺伝子を介した NTG の発症メカニズムおよび病態の解明を行った。

遺伝子発現量の検討

遺伝子多型や遺伝子変異は遺伝子の発現量にしばしば影響を与えるため、NTG の発症パスウェイに関与する遺伝子多型・変異と遺伝子発現量の関連を調査した。TaqMan リアルタイム PCR アッセイ(Thermo Fisher Scientific 社)を用いて疾患感受性遺伝子の発現量を定量し、遺伝子多型・変異の遺伝子型の違いによる疾患感受性遺伝子の発現量の変動が NTG の発症パスウェイに与える影響を評価した。

疾患感受性遺伝子の立体構造解析

アミノ酸置換を伴う遺伝子多型・変異が同定された場合、同定した遺伝子多型・変異がタンパク質の機能に与える影響を立体構造解析により評価した。具体的には、アミノ酸置換前後におけるタンパク質の立体構造・分子動力の比較および他のタンパク分子との相互作用の変動を評価し、NTG 発症パスウェイに与える影響を検討した。本解析では、Modeller ソフトウェア(<http://salilab.org/modeller/>)と Meta-PPISP サーバー(<http://pipe.scs.fsu.edu/meta-ppisp/>)を用いた。

疾患感受性遺伝子の眼組織における局在の解析

NTG 発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子について、マウス眼球内における局在を確認するため、*in situ* hybridization を行った。胎仔 16.5 日齢、生後 0 日、90 日のマウスを対象に疾患感受性遺伝子の発現の局在を解析した。

SiRNA 導入による感受性遺伝子のノックダウン

SiRNA(small interfering RNA)を用いたノックダウン法は、遺伝子発現抑制効果が高いため、遺伝子発現制御機構の解明に効果的である。本解析では、遺伝子発現が確認された組織の細胞に目的遺伝子に対する SiRNA 発現ベクターを導入したのち、細胞の動態を観察し、遺伝子の発現量抑制が細胞に与える影響を検討した。

(5) 本研究では、すべての血液検体提供者(NTG 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。すべての血液検体提供者の個人情報(連結匿名化)の上、本研究に関与しない個人情報管理者によって厳重に管理されている。

(6) 本研究は、横浜市立大学の人を対象とする生命科学・医学系研究倫理委員会の審査・承認を得て実行した。

4. 研究成果

1) これまでに報告されている NTG の疾患感受性遺伝子を PubMed、Web of Science、Scopus、ScienceDirect、Embase および Google Scholar の各データベースを用いて網羅的にピックアップした。

(2) 各既報の研究から、「解析サンプル数」、「P値」、「オッズ比」、「95%信頼区間」、「遺伝子多型のアリル頻度」の情報を抽出してパスウェイ解析を実行し、NTGの発症と統計学的有意に相関を示すパスウェイを網羅的に検出した。

(3) (2)において網羅的に検出したNTG発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子について、日本人集団（NTG患者、健常者）を用いて、TaqManアッセイによるSNP（single nucleotide polymorphism：一塩基多型）解析（追認試験）を実行し、NTG発症パスウェイの絞り込みを行った。

(4) 追認試験で同定したNTG発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子を対象に機能解析を実行した結果、複数の疾患感受性遺伝子において、遺伝子多型の遺伝子型の違いに起因する疾患感受性遺伝子の発現量の変動がNTGの発症パスウェイに有意な影響を与えていることが見出された。

(5) 本研究の成果は、NTG発症パスウェイに関与する疾患感受性遺伝子（分子）を対象とした効果的な治療薬の開発を可能にすると考えている。今後、疾患感受性遺伝子のゲノム情報を基に、標的分子の機能を制御できる医薬分子の候補を網羅的にスクリーニングし、患者個々の遺伝要因に応じた治療薬（ゲノム創薬）を探索する予定である。

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