

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 6日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790324

研究課題名（和文）緑内障関連染色体領域の遺伝子発現調節機構に対するSNPの影響の解析

研究課題名（英文）Analyzing glaucoma-associated variants to reveal molecular mechanism of glaucoma pathogenesis

研究代表者

中野 正和（NAKANO MASAKAZU）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：70381944

研究成果の概要（和文）：緑内障は本邦における中途失明原因の第一位であり、失明を予防するためにも発症早期にリスク保因者を選別し治療を開始することを可能にする簡便な血液検査体制（ゲノム診断）の構築が切望されている。我々は、緑内障患者に特有なゲノム配列の違い（バリエント）を同定するために、緑内障の主病型である原発開放隅角緑内障（primary open-angle glaucoma, POAG）のゲノムワイド関連解析（genome-wide association study, GWAS）を世界に先駆けて実施し、POAGに関連するヒト染色体上の3領域に存在する6つのバリエントを同定した（中野ら, *PNAS*, 106: 12838-12842, 2009）。一方、本研究の実施期間中に我々以外のグループからもPOAGのGWAS結果が報告され始め、いずれの報告も我々の結果とは異なる染色体領域を提示していた。そこで本研究では、緑内障関連染色体領域の遺伝子発現調節機構に対するバリエントの影響の解析に向けて、統計学的検出力の高いGWASを新たに実施し、真の緑内障関連バリエントの同定を目指した。

まず、2005年以来本学附属病院にてインフォームド・コンセントを得て収集している臨床検体の中から2,126検体を選別し、全ゲノムにわたる906,600個のバリエントのジェノタイプを決定した。次に、臨床診断情報に基づきPOAG群833例と非緑内障対照群686例を厳選し、653,519個の高精度なジェノタイプデータを抽出して相関解析を実施した。加えて、POAG群を眼圧測定値により高眼圧群（high pressure glaucoma, HPG; 330例）と日本人POAG患者の90%以上が分類される正常眼圧緑内障（normal pressure glaucoma, NPG; 503例）の2群に分けた場合についての相関解析も実施した。

POAGのGWASの結果、新たにヒト染色体の9p21領域に存在する*CDKN2B-AS1*上にボンフェローニ補正を超える有意なバリエントを5つ同定した。また、POAG群をHPG群とNPG群に分けて解析した結果、POAG群と完全に一致する*CDKN2B-AS1*上のバリエントがNPG群でのみ有意に検出された。従って、*CDKN2B-AS1*上のバリエントは視神経乳頭の脆弱性など眼圧の高さによらない発症メカニズムに関与し得ることが示唆された。一方、9p21領域は遺伝子砂漠であり*CDKN2B-AS1*もノンコーディング遺伝子であることから、今後本領域を精査していくことで緑内障の病態との関連性を追究していきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Glaucoma is a neurodegenerative ocular disease and one of the leading causes of irreversible blindness worldwide. It has been considered that genetic factors play a significant role in the pathogenesis of glaucoma, although only a small portion of the genetic variation for primary open-angle glaucoma (POAG), the major type of glaucoma, has been elucidated. We previously reported a genome-wide association study (GWAS), and identified six variants that were modestly associated with POAG (Nakano et al., *PNAS*, 106: 12838-12842, 2009). However, the association result was not reproducible in the other studies. Therefore, in order to discover authentic variant(s) for POAG, we

further performed a GWAS with an improved statistical power by analyzing 653,519 autosomal common variants using a different Japanese population of 833 POAG patients and 686 controls. As a result, we successfully identified 5 variants that passed the Bonferroni correction in *CDKN2B-AS1* on chromosome 9p21, a non-coding “gene desert” locus. We also subdivided the case group into two subtypes based on the measurement of intraocular pressure (IOP): POAG with high IOP (high pressure glaucoma, HPG) and that with normal IOP (normal pressure glaucoma, NPG), because most of the Japanese POAG patients (>90%) were categorized into NPG group. Interestingly, we found that the variants from the same *CDKN2B-AS1* locus were likely to be significant only for NPG patients. Since the variants of 9p21 found to be associated with a variety of common diseases and seemed to affect the expression of not only adjacent but also distant genes, it would be important to continue the detailed investigation by obtaining in-depth sequencing data across the locus in order to identify the target gene(s) and reveal the molecular mechanism of glaucoma pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：ゲノム医科学・分子生物学
 科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学
 キーワード：分子病態学

1. 研究開始当初の背景

緑内障は網膜の神経線維層が障害され発症する眼疾患で、本邦では中途失明原因の第一位である。緑内障による失明を予防するには、眼圧降下剤の点眼治療などによる対処療法を発症早期に開始することが望ましい。しかし、緑内障の自覚症状は乏しい上、専門医による眼底検査に依存している現行の診断では発症初期の患者を発見するのは困難である。一方、緑内障のリスク因子として家族歴等の遺伝の関与が知られていることから、発症リスク保因者を選別する簡便な血液検査体制（ゲノム診断）の構築が切望されている。

我々は、緑内障患者に特有なゲノム配列の違い（バリエーション）を同定するために、緑内障の主病型である原発開放隅角緑内障（primary open-angle glaucoma, POAG）のゲノムワイド関連解析（genome-wide

association study, GWAS）を世界に先駆けて実施し、POAGに関連するヒト染色体上の3領域に存在する6つのバリエーションを同定した（中野ら, *PNAS*, 106: 12838-12842, 2009）。一方、本研究の実施期間中に我々以外のグループからもPOAGのGWAS結果が報告され始め、いずれの報告も我々の結果とは異なる染色体領域を提示していた。これは、使用した検体の人種や数、病型等の諸条件が異なることに起因することが推察される。

2. 研究の目的

本研究では、緑内障関連染色体領域の遺伝子発現調節機構に対するバリエーションの影響の解析に向けて、統計学的検出力の高いGWASを新たに実施し、真の緑内障関連バリエーションが存在する染色体領域の同定を目指した。

3. 研究の方法

2005年以来本学附属病院にてインフォームド・コンセントを得て収集している臨床検体の中から2,126検体を選別し、アフィメトリクス社のDNAマイクロアレイ

(Genome-Wide Human SNP Array 6.0) を用いて906,600個のバリエーションのジェノタイプを決定した。次に、臨床診断情報に基づきPOAG群833例と非緑内障対照群686例を厳選し、厳格なフィルターにより抽出した653,519個の高精度なジェノタイプデータを用いて相関解析を実施した。加えて、日本人POAG患者の90%以上が正常眼圧緑内障

(normal pressure glaucoma, NPG) に分類され、緑内障のリスク因子の一つである高眼圧とは異なる要因が発症に関与している可能性が高いことから、POAG群を眼圧測定値により高眼圧群 (high pressure glaucoma, HPG; 330例) と正常眼圧群 (NPG; 503例) の2群に分けた場合についての相関解析も実施した。

4. 研究成果

POAGのGWASの結果、新たにヒト染色体の9p21領域に存在する *CDKN2B-AS1* 上にボンフェローニ補正を超える有意なバリエーションを5つ同定した (図1)。

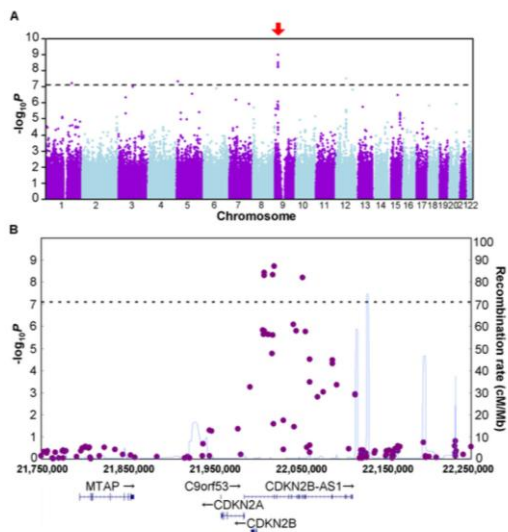


図1. 原発開放隅角緑内障のゲノムワイド関連解析。ヒト9番染色体上(A)の *CDKN2B-AS1* (B) にボンフェローニ補正 (破線) を越すバリエーションを5つ同定した。

また、POAG群をHPG群とNPG群に分けて解析した結果、POAG群と完全に一致する *CDKN2B-AS1* 上のバリエーションがNPG群でのみ有意に検出された。 *CDKN2B-AS1* 上のバリエーションはオーストラリア系の白人でもPOAGに関連することが報告されている (Burdonら, *Nat. Genet.*, 43: 574-578, 2011) が、我々の検討ではこれらのバリエーションは白人で罹患頻度の多いHPG患者では有意ではなく、NPG患者でのみ有意であった。

従って、 *CDKN2B-AS1* 上のバリエーションは視神経乳頭の脆弱性など眼圧の高さによらない発症メカニズムに関与し得ることが示唆された。一方、9p21領域は心疾患や糖尿病を始めとする複数の多因子疾患と関連することが報告されている遺伝子砂漠であり、 *CDKN2B-AS1* もRNAには転写されるもののタンパク質には翻訳されないノンコーディング遺伝子である。最近、冠動脈疾患において9p21に存在するエンハンサー配列が約950 kbも離れた遺伝子の発現を調節していることを明らかにした研究が報告された (Harismendyら, *Nature*, 470: 264-268, 2011) ことから、今後同様の手法を用いて本領域を精査していくことで緑内障の病態との関連性を追究していきたいと考えている。

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10件)

① Nakano, M., Ikeda, Y., Tokuda, Y., Fuwa, M., Omi, N., Ueno, M., Imai, K., Adachi, H., Kageyama, M., Mori, K., Kinoshita, S. and Tashiro, K. Common variants in *CDKN2B-AS1* associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by genome-wide association studies in Japanese. *PLoS ONE*, 査読有, 7: e33389, 2012.

DOI:10.1371/journal.pone.0033389

② Nakano, M. and Tashiro, K. Association studies getting broader: a commentary on 'A polymorphism of the *POLG2* gene is genetically associated with the invasiveness of urinary bladder cancer in Japanese males'. *J. Hum. Genet.*, 査読有, 56: 550-551, 2011.

DOI: 10.1038/jhg.2011.70

③ Kinsella, M., Harismendy, O., Nakano, M., Frazer, K. A. and Bafna, V. Sensitive gene fusion detection using ambiguously mapping RNA-Seq read pairs. *Bioinformatics*, 査読有, 27: 1068-1075, 2011.

DOI: 10.1093/bioinformatics/btr085

④ Harismendy, O., Bansal, V., Bhatia, G., Nakano, M., Scott, M., Wang, X. C., Dib, C., Turlotte, E., Sipe, J. C., Murray, S. S., Deleuze, J. F., Bafna, V., Topol, E. J. and Frazer, K. A. Population sequencing of two endocannabinoid metabolic genes identifies rare and common regulatory variants associated with extreme obesity and metabolite level. *Genome*

Biol., 査読有, 11: R118, 2010.

DOI:10.1186/gb-2010-11-11-r118

- ⑤ Ueta, M., Sotozono, C., Nakano, M., Taniguchi, T., Yagi, T., Tokuda, Y., Fuwa, M., Inatomi, T., Yokoi, N., Tashiro, K. and Kinoshita, S. Association between prostaglandin E receptor 3 polymorphisms and Stevens-Johnson syndrome identified by means of a genome-wide association study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 査読有, 126: 1218-1225, 2010.

DOI:10.1016/j.jaci.2010.08.007

- ⑥ 中野正和, 池田陽子, 森和彦. 緑内障 Genome-Wide Association Study最新の知見: 2. 次世代シーケンサーをいかに活用するか, あたらしい眼科, 査読無, 29: 355-357, 2012.
- ⑦ 池田陽子, 中野正和, 森和彦. 緑内障 Genome-Wide Association Study最新の知見: 1. どう見て、どう考えるか, あたらしい眼科, 査読無, 29: 209-210, 2012.
- ⑧ 池田陽子, 中野正和, 森和彦. 眼科診療: 5年前の常識は現在の非常識. 3. 緑内障 スペシャルレクチャー. 緑内障の遺伝子, 臨床眼科, 査読無, 65: 238-242, 2011.
- ⑨ 池田陽子, 中野正和, 田代啓, 森和彦, 木下茂. 緑内障の検査診断学. 3. 遺伝子診断, 眼科, 査読無, 53: 207-220, 2011.
- ⑩ 中野正和, 田代啓. 大規模シーケンサー解析用ヒトゲノム標的配列濃縮法, 実験医学, 査読無, 28: 3147-3153, 2010.

[学会発表] (計3件)

- ① 中野正和. これからのゲノムワイド関連解析における次世代技術の活用法, 第12回眼科DNAチップ研究会, 東京, 2011年10月7日.
- ② 中野正和. Genome-wide association studies: From statistical significance to functional annotation, サイエンス交流会: 次世代シーケンサーをもちいた最先端ゲノム解析, 京都, 2011年7月11日.
- ③ 不破正博, 池田陽子, 中野正和, 谷口孝純, 徳田雄市, 大見奈津江, 八木知人, 田中雅深, 上野盛夫, 森和彦, 木下茂, 田代啓. 緑内障の主病型である原発開放隅角緑内障に関連する多型の網羅的解析, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010年12月10日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 正和 (NAKANO MASAKAZU)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 70381944

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号: