

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659160

研究課題名（和文）診断に検討課題が残る欧米発ゲノムワイド関連解析結果への日本人症例解析での理解深化

研究課題名（英文）Gain more insight, perform the following genome-wide association studies in Japanese, counterargument to the study that need correct re-diagnosis by Europe-an study.

研究代表者

田代 啓 (TASHIRO KEI)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10263097

研究成果の概要（和文）：我々は厳密に診断した日本人集団の緑内障群と正常対照群について、高密度チップによる 2 段階の緑内障ゲノムワイド関連解析を実施した。広義の原発性開放隅角緑内障（広義 POAG: 正常眼圧緑内障 normal pressure glaucoma; NPG + 狭義原発性開放隅角緑内障 Primaryopen-angle glaucoma; POAG）833 例・対照 686 例を源泉し、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。さらに眼圧値で症例群を NPG と POAG に細分類した解析の結果、NPG に特異的な *CDKN2B-AS1* 遺伝子を同定した (*PLoS ONE*: 7: e33389, 2012)。その結果を用いてネガコンの一般集団と正常対照群の差を計算した。また落屑緑内障に関しては疾患 190 例・対照 660 例の解析を実施し有意な遺伝子を同定した。現在再現性を検討中である。

研究成果の概要（英文）：We examined our two data sets of the genome-wide association studies (GWAS) derived from a Japanese population was strictly classified as glaucoma and controls with detail examination and diagnosis. We performed a GWAS by analyzing 653,519 autosomal common single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in 833 POAG patients and 686 controls. We then subdivided the case groups into two subtypes based on the value of intraocular pressure (IOP) -POAG with high IOP (high Pressure glaucoma, HPG) and that with normal IOP (normal pressure glaucoma, NPG) performed the GWAS. The results suggested that the variants from *CDKN2B-AS1* locus were likely to be significant for NPG patients (*PLoS ONE*: 7: e33389, 2012). On the other hand we performed a case-control study using 190 Japanese exfoliation glaucoma (XFG) patients and 660 controls. It is currently under consideration of replication study of the association to identify specific marker for XFG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ゲノム医化学

## 1. 研究開始当初の背景

2010年アイスランドの deCODE genetics 社他の欧米グループが発表した表向きは原発開放隅角緑内障 1,263 例、対照 34,877 例と主張された大規模なゲノムワイド関連解析 (GWAS) (Thorleifsson G. et. al., 2010) では、*Caveolin* が疾患マーカー遺伝子として同定されるとともに、同じメンバーを含む北欧グループが落屑緑内障のマーカーとして同定済みの *LOXLI* が *P* 値の 2 位となった。このことは、ケース群に落屑緑内障が 20% 程度多数混入していることが強く示唆される。また、対照群は緑内障患者を除こうとしているものの、精密検査をしていないので数%程度緑内障症例を混入している正常対照群による解析となっている点の影響を解明する必要がある。

さらに *Caveolin* の一塩基配列の違い (SNP) に関しては白人にはあるが、日本人にはないものであることが判明し、人種差の存在がまた浮き彫りになった。この研究例での原発開放隅角緑内障 (POAG) の GWAS への落屑緑内障の混入は、「診断」とは何かという哲学的疑問が心に湧いて来るほどに大規模である。同じメンバーが *LOXLI* を同定した落屑緑内障の GWAS も一番乗りで発表している (Thorleifsson G., et. al., 2007) ので、落屑緑内障について決して無知である筈が無い故に「診断に検討課題が残る」と敢えてここに記載する。彼らに症例選択と診断について再考を促すためには、彼らの診断への類縁疾患の混入がどの程度であったかを日本人の精密診断に基づく仮想的検体群のメタレベル解析によって、どういう比率で類縁疾患が混入すれば欧米研究と同じ結果がえられるのかを割り出して突きつけるのが最

良の方策だと考えられる。

## 2. 研究の目的

一流誌に論文発表されている多因子疾患大規模ゲノムワイド関連解析は診断も研究手法も信頼性が高いと暗黙のうちに大多数の人々に信じられているが、明らかに診断に問題があり類縁疾患である落屑緑内障が混入している原発開放隅角緑内障研究例と、カイ2乗検定 *p* 値1位の落屑緑内障関連遺伝子のリスクアレルの方向が欧米と日本で逆なので病因となる別の SNP の存在が強く疑われる落屑緑内障研究例が、アイスランドなど欧米から出ている。今回の目的は、落屑緑内障について日本で厳密に診断された世界最大の症例数の疾患群と対照群の間で客観性の高い GWAS を世界標準最新チップであるアフィメトリクス社 1000K チップを用いて実行して落屑緑内障関連遺伝子を今一度中立的態度で同定してゲノム診断や病因解明につなげることと、どういう比率で類縁疾患が混入すれば欧米研究と同じ結果がえられるのかを仮想的検体群のメタレベル解析によって問題点を解明することである。

## 3. 研究の方法

2010年に欧米のグループが発表した原発開放隅角緑内障の大規模ゲノムワイド関連解析には落屑緑内障のマーカーとして既に同定されていた *LOXLI* が含まれていた。このことは、ケースコントロール解析における「症例群」のサンプル中に、原発開放隅角緑内障と鑑別判断が難しい落屑緑内障が 20% 程度混入していると強く疑われた。落屑緑内障は瞳孔縁、水晶体表面に特徴的な偽落屑物質が認められる偽落屑症候群によって発症する続発性の緑内障で、70歳以上

に多発し、高齢者の失明原因として重要な疾患である。本学緑内障専門外来では視野異常をきたしている緑内障症例のうち、瞳孔縁、水晶体囊に付着する落屑物質を生体顕微鏡で確認し、さらに隅角検査の色素高位付着を参考に、熟練した緑内障専門医が厳密に診断を行った。研究協力の書面による同意を得て血液を採取した。すべての検体は匿名化後、DNAを抽出した。正常対照は 1,000 人以上の協力者から研究協力の書面による同意を得て、緑内障患者と全く同じ精密検査を実施し、厳密な正常対照群を選別した。緑内障専門医が診察をおこなったうえで、複数の緑内障専門医が「緑内障でない」と判定した検体を正常対照群とした。さらにこの中から、問診上の緑内障家族歴のあるものを除外した。正常対照群に疾患例が混入することでヨーロッパや日本のグループの GWAS が失敗していることが疑われるので、我々の除外診断をした正常対照群に 1%、3% の疾患例を混入して GWAS 計算を行った。また、落屑緑内障について 190 例の疾患群と 660 例の健常者群で GWAS を実施した。

#### 4. 研究成果

2009年に我々は、全ゲノムにわたる50万個の SNP を解析するGWASを実施し、広義原発開放隅角緑内障(広義POAG)に関連するSNPを報告した。更に、2012年にはこれらのジェノタイプデータと緑内障患者の末梢血中のサイトカイン量とを組み合わせた緑内障統合的分子診断法のプロトタイプを開発し報告した。本研究では、本診断法に用いるジェノタイプデータの精度の向上のために、統計学的検出力を増大させた広義POAGのGWASを新たに実施した。その結果、ヒト染色体9p21.3領域に存在する*CDKN2B-AS1*上にボンフェローニ補正を超える5個のSNPを同

定することに成功した。更に、広義POAGを眼圧が高いHPG群と正常範囲であるNPG群の2群に分けて相関解析を行ったところ、広義POAGで同定された*CDKN2B-AS1*バリエーションがNPG群でのみ有意に検出された。本研究により、広義POAGに非常に強い相関を示すSNPかつHPG群とNPG群を識別することが可能なSNPを同定することができたことから、GWASの実施においては厳格な診断による集団の選別と、厳選されたデータ抽出による解析が重要であることが証明できた。また、今回の落屑緑内障のGWASの結果、ヒト染色体上にボンフェローニ補正を超える有意なSNPが同定された。

統計学的検出力の高いGWASを新たに実施したことにより、広義POAGに非常に強い相関を示すSNPを同定することに成功したことから、緑落ちる内障の分子学的診断法の精度の向上に寄与することが期待される。一方、これらのSNPは落屑緑内障を識別することが可能な有用なSNPが同定されたと考えられる。

正常対照群に疾患例を混入するシミュレーション計算を実施した。落屑緑内障ではN数が小さくて任意抽出ごとの乱れが大きすぎるので、POAG結果を用いて計算した。POAGでは混入によって一般集団に近い挙動を示した。今後、N数を上げて確認するための手がかりをつかめた。

#### 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 8 件)

- (1) Ishida, K., Yagi, T., Tanaka, M., Tokuda, Y., Kamoi, K., Hongo, F., Kawachi, A., Nakano, M., Miki, T., Tashiro, K.

- Identification of a novel gene by whole human genome tiling array. *Gene*, 1: 33-38, 2013. 査読有. doi: 10.1016/j.gene.2012.11.076.
- (2) Tokuda, Y., Yagi, T., Yoshii, K., Ikeda, Y., Fuwa, M., Ueno, M., Nakano, M., Omi, N., Tanaka, M., Mori, K., Kageyama, M., Nagasaki, I., Yagi, K., Kinoshita, S. and Tashiro, K. An approach to predict the risk of glaucoma development by integrating different attribute data. *SpringerPlus*, 1: 41, 2012. 査読有. doi:10.1186/2193-1801-1-41.
- (3) Ishigami, N., Tokuda, T., Ikegawa, M., Komori, M., Kasai, T., Kondo, T., Matsuyama, Y., Nirasawa, T., Thiele, H., Tashiro, K., Nakagawa, M. Cerebrospinal fluid proteomic patterns discriminate Parkinson's diseases and multiple system atrophy. *Movement Disorders*. 27: 851-857, 2012. 査読有. doi: 10.1002/mds.24994.
- (4) Ueta, M., Tamiya, G., Tokunaga, K., Sotozono, C., Ueki, M., Sawai, H., Inatomi, T., Matsuoka, T., Akira, S., Narumiya, S., Tashiro, K., Kinoshita, S. Epistatic interaction between Toll-like receptor 3 (TLR3) and prostaglandin E receptor 3 (PTGER3) genes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 129: 1413-1416, 2012. 査読有. doi: 10.1016/j.jaci.2012.01.069.
- (5) Komori, M., Matsuyama, Y., Nirasawa, T., Thiele, H., Becker, M., Alexandrov, T., Saida, T., Tanaka, M., Matsuo, H., Tomimoto, H., Takahashi, R., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kondo, T. Proteomic pattern analysis discriminates among multiple sclerosis-related disorders. *Ann. Neurol.*, 71: 614-623, 2012. 査読有. doi: 10.1002/ana.22633.
- (6) Nakano, M., Ikeda, Y., Tokuda, Y., Fuwa, M., Omi, N., Ueno, M., Imai, K., Adchi, 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*, 7: e33389, 2012. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0033389.
- (7) 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.*, 56: 550-551, 2011. 査読有. doi:10.1038/jhg.2011.70.
- (8) Yagi, T., Sotozono, C., Fuwa, M., Ueta, M., Tashiro, K. and Kinoshita, S. Cytokine storm arising on the ocular surface in a patient with Stevens-Johnson syndrome. *Br. J. Ophthalmol.*, 95: 1030-1031, 2011. 査読有. doi:10.1136/bjo.2010.196295.

〔学会発表〕（計 19 件）

- ① 徳田雄市, 田中雅深, 石田博万, 八木知人, 三木恒治, 田代啓. Research for novel gene with HECT domain. HECT, ドメインを有する新規遺伝子の研究, 第85回日本生化学会大会, 福岡, 2012年12月14日-16日.
- ② Maruyama, Y., Mori, K., Yoshii, H., Yoshikawa, H., Ikeda, Y., Ueno, M., Tashiro, K., Kinoshita, S. Analysis of Hematological and Biochemical Data in Primary Open - Angle Glaucoma Patients. Asia Pacific Glaucoma Congress, Bali, Indonesia, 2012.12.7-9.

- ③ Nakano, M., Ikeda, Y., Tokuda, Y., Fuwa, M., Omi, N., Adachi, H., Ueno, M., Mori, K., Kinoshita, S. and Tahiro, K. Common genetic variants of primary open-angle glaucoma in Japanese Population. 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 2012.11.06-10.
- ④ 池田陽子, 森 和彦, 上野盛夫, 今井浩二郎, 中野正和, 徳田雄市, 大見奈津江, 佐藤隆一, 田代啓. 木下茂. CDKN2B-AS1の病型別原発開放隅角緑内障全ゲノム関連解析. 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012年10月25日-28日.
- ⑤ 森 和彦, 池田陽子, 上野盛夫, 今井浩二郎, 中野正和, 徳田雄市, 佐藤隆一, 足立博子, 田代啓, 木下茂. 原発開放隅角緑内障の1000Kチップによる全ゲノム関連解析. 第66回日本臨床眼科学会, 京都, 2012年10月25日-28日.
- ⑥ 徳田雄市, 田中雅深, 八木知人, 田代啓. The defects of Sfrp2 reveal modulating calcium signaling in lymphocytes. 第74回日本血液学会学術集会, 京都, 2012年10月19日-21日.
- ⑦ 吉井健吾, 池田陽子, 森 和彦, 上野盛夫, 丸山悠子, 吉川晴菜, 中野正和, 見奈津江, 徳田雄市, 田代啓, 木下茂. 原発開放隅角緑内障患者における血液生化学データの解析. 第23回日本緑内障学会, 金沢, 2012年9月28日-30日.
- ⑧ Ikeda, Y., Mori, K., Ueno, M., Imai, K., Nakano, M., Fuwa, M., Yoshii, K., Yagi, Y., Tokuda, Y., Tashiro, K. and Kinoshita, S. Association of risk alleles of glaucoma marker SNPs with morphological characters of the optic disc. 10<sup>th</sup> Congress of the European Glaucoma Society. Copenhagen, Denmark, 2012.6.8-22.
- ⑨ 足立博子, 丸山悠子, 米田一仁, 丸山和一, 木下茂, 中野正和, 田代啓. 網膜における血管新生に関連する遺伝子の網羅的発現解析. 第59回日本生化学会近畿支部例会, 京都, 2012年5月19日.
- ⑩ Mori, K., Ikeda, Y., Ueno, M., Imai, K., Nakano, M., Tokuda, Y., Omi, N., Adachi, H., Tashiro, K. and Kinoshita, S. Genome-wide association study on primary open-angle glaucoma with a 1000K gene chip. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. Florida, USA, 2012.5.6-10.
- ⑪ Mori, K., Ikeda, Y., Ueno, M., Imai, K., Nakano, M., Tokuda, Y., Omi, N., Adachi, H., Tashiro, K. and Kinoshita, S. Genome-wide association study on primary open-angle glaucoma with a 1000K gene chip. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Florida, USA, 2012.5.6-10.
- ⑫ 池田陽子, 吉井健吾, 森和彦, 上野盛夫, 中野正和, 徳田雄市, 大見奈津江, 八木知人, 今井浩二郎, 田代啓, 木下茂. 正常者における緑内障疾患マーカーSNPと血液生化学データの関連性の検討. 第22回日本緑内障学会, 秋田, 2011年9月23日-25日.
- ⑬ 徳田雄市, 田中雅深, 石田博万, 八木知人, 三木恒治, 田代啓. DNAマイクロアレイを用いた新規遺伝子の探索. 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011年9月21日-24日.
- ⑭ Tashiro, K. and Kinoshita, S. Candidate gene analysis of primary open-angle glaucoma in a Japanese population using a

custom chip. World Glaucoma Congress, Paris, France, 2011.6.29-7.2.

- ⑮ Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Imai K, Yagi T, Omi N, Tokuda Y, Fuwa M, Tashiro K, Kinoshita S. Association Between General Systematic Disease and the Marker Snps for Primary Open-Angle Glaucoma. World Glaucoma Congress, Paris, France. 2011.6.29-7.2.
- ⑯ 田代啓, 池田陽子, 中野正和, 大見奈津江, 森和彦, 木下茂. DNAマイクロアレイ検査の将来展望. 遺伝医学合同学術集会2011, 京都, 2011年6月16日-19日.
- ⑰ 大見奈津江, 徳田雄市, 足立博子, 池田陽子, 上野盛夫, 森和彦, 中野正和, 木下茂, 田代啓. 溶血法を用いたEBウイルス細胞株の簡易迅速樹立法の検討. 第58回日本生化学会近畿支部例会, 大阪, 2011年5月21日.
- ⑱ 池田陽子, 森和彦, 上野盛夫, 今井浩二郎, 不破正博, 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, 田代啓, 木下茂. 原発開放隅角緑内障関連遺伝子に対するカスタムチップ解析. 第115回日本眼科学会総会, 東京, 2011年5月12日-15日.
- ⑲ Ikeda, Y., Mori, K., Ueno, M., Imai, K., Fuwa, M., Tokuda, Y., Nakano, M., Yagi, T., Tashiro, K. and Kinoshita, S. Candidate gene analysis of primary open-angle glaucoma in a Japanese population using a custom chip. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Florida, USA, 2011.5.1-5.

〔図書〕(計1件)

- 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, 53: 207-220, 2011.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田代 啓 (TASHIRO KEI)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 1 0 2 6 3 0 9 7