

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790323

研究課題名(和文) 緑内障に関連する遺伝子砂漠領域のリシーケンス解析による発症機序の解明

研究課題名(英文) Resequencing analysis of glaucoma-associated chromosome loci

## 研究代表者

中野 正和 (Nakano, Masakazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70381944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々が同定した緑内障に関連する染色体領域の近傍には遺伝子が存在しなかったため、本領域には遠隔遺伝子の発現を制御する機構が潜在する可能性が高い。従って、緑内障の発症機序を解明するためには本領域をリシーケンス解析することが重要である。一方、多因子疾患である緑内障の病態の全容を解明するためには本領域の精査だけでは不十分である。

そこで本研究では、ゲノムワイド関連解析の結果に基づきリシーケンス解析すべき候補領域を抽出する手法の開発を試みた。その結果、我々独自の手法として、データマイニングで汎用されている主成分分析を応用し、因子負荷量を基準に領域を規定する客観的かつ効率的な手法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：We previously performed a genome-wide association study (GWAS) and identified 5 variants associated with glaucoma on chromosome 9p21, which is known as a non-coding "gene desert" locus. Since 9p21 region 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 should be important to continue further investigation by obtaining in-depth sequencing data across the locus. Moreover, in order to reveal the complex mechanism of glaucoma pathogenesis, it is apparent that the other multiple loci should also be resequenced.

To this end, we attempted to establish a method utilizing the GWAS data in order to extract the loci to be resequenced, and successfully developed a novel method by applying the principle component analysis. The method established in this study should be a robust tool for determining the loci based on the GWAS data useful for the subsequent resequencing analysis.

研究分野：医歯薬学

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 ゲノムワイド関連解析 バリエーション 次世代シーケンサー 遺伝子発現調節 緑内障

### 1. 研究開始当初の背景

我々は既に、日本人検体を用いたゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study, GWAS) を実施し、原発開放隅角緑内障 (primary open-angle glaucoma, POAG) に強く関連する一塩基の配列の違い (バリエーション) をヒト染色体9p21.3領域の *CDKN2B-AS1* 上から同定することに成功している (Nakanoら, *PLoS ONE*, 2012)。しかし、本領域は周辺にタンパク質をコードする遺伝子が存在しない、いわゆる“遺伝子砂漠”領域であり、*CDKN2B-AS1* も機能未知の非コード遺伝子であることから、同定されたバリエーションが調節配列上にあり遠隔遺伝子の発現に影響を及ぼしている可能性が高いことが示唆された。従って、本領域をリシーケンス解析し、潜在する調節配列やその標的遺伝子を同定することは POAG の発症機序を解明する上で極めて重要である。しかし、多因子疾患である POAG の病態解明には POAG との関連性が最も強かった 9p21.3 領域を精査するだけでは不十分であり、GWAS の結果からどの染色体領域を疾患関連領域として精査すべきかを判断する客観的手法の開発が望まれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、緑内障に関連する遺伝子砂漠領域のリシーケンス解析による発症機序の解明に向けて、GWAS の結果に基づきリシーケンス解析すべき候補領域を抽出する手法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

まず、従来の候補領域の選定方法として、GWAS の結果得られた統計学的有意差 ( $p$  値) を基準にバリエーションを選択し、これらのバリエーションが 150 kb 以内に連続して 3 個存在する領域を特定した。更に、互いに連鎖するバリエーションの範囲を規定する連鎖不平衡情報を参照して領域の範囲を決定した。一方、我々独自の抽出方法として、データマイニング等で用いられている主成分分析 (principle component analysis, PCA) の応用を試みた。POAG の GWAS で用いた POAG 患者 (ケース) 824 例と非緑内障健康人 (コントロール) 686 例のバリエーションデータの類似度や特徴を得るため、コントロールを基準にした数値変換を行い、PCA に供し、因子負荷量 (主成分と元の変数との間の相関係数に相当) を求めた。各バリエーションの最も高い因子負荷量の絶対値を示

す主成分を基準に分類し、候補領域を決定した。

### 4. 研究成果

解析対象バリエーションを選択する基準として GWAS の結果に基づき統計学的有意差を  $p < 10^{-5}$  に設定したところ、135 個のバリエーションが抽出された。まず、これらのバリエーションを用いて従来の方法で候補領域を抽出した結果、9p21.3 を含む 10 領域を取得した (図1)。

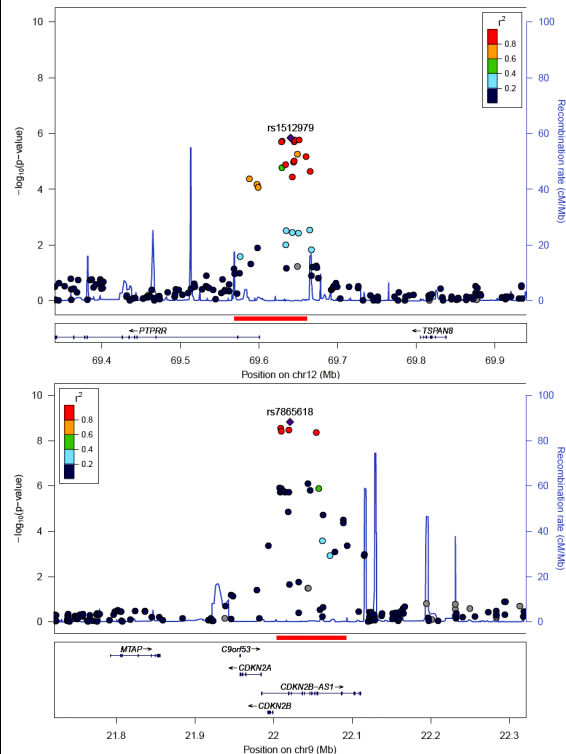


図1. リシーケンス解析候補領域例

しかし、本法ではバリエーションどうしの連鎖不平衡状態が弱い場合には範囲の規定が難しい上に、複数の候補領域の優先順位を決める客観的指標に乏しいことが判明した。

一方、PCAによる因子負荷量を計算し、各バリエーションの散布図 (x軸: 第1主成分、y軸: 第2主成分) から各主成分において因子負荷量の大きいバリエーションのクラスターが染色体近傍に存在するバリエーションどうして形成されていることが観察された (図2)。

次に、我々が独自に考案した領域候補の抽出方法として、各バリエーションが最も高い因子負荷量の絶対値を示す主成分を基準に分類したところ、相関係数が0.90を越えるバリエーションを含む領域が6領域抽出された (表1)。かつその範囲が明確に規定された (図1, 赤太線)。以上の結果から、PCAを応用することによってGWASの結果に基

づく疾患関連候補領域を抽出する客観的かつ効率的な手法を確立することができた。

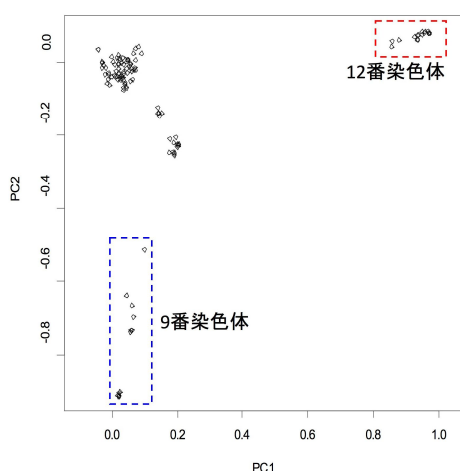


図2. 第1主成分(PC1)と第2主成分(PC2)の因子負荷量の散布図

表. PCAによって抽出された候補領域

主成分	染色体	距離	バリエーション数	代表P値 ( $-\log_{10}P$ )
1	12	77190	18	5.84
2	9	80783	18	8.82
3	15	140086	13	5.45
4	4	37109	7	4.45
5	2	16667	7	5.04
6	7	89510	4	4.72

以上の結果から、PCAを応用することによってGWASの結果に基づく疾患関連候補領域を抽出する客観的かつ効率的な手法を確立することができた。本研究で開発することに成功した我々独自のPCAを応用した候補領域の抽出方法は、疾患の発症機序の解明に必須であるリシーケンス解析を実施するための客観的かつ効率的な候補領域の抽出方法として、あらゆるGWASに応用可能な基盤技術になると考えられる。

## 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3件)

Ishida, H., Yagi, T., Tanaka, M., Tokuda, Y., Kamoi, K., Hongo, F., Kawachi, A., Nakano, M., Miki, T. and Tashiro, K. Identification of a novel gene by whole human genome

tiling array. *Gene*, 査読有, 516: 33-38, 2013.

DOI: 10.1016/j.gene.2012.11.076

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*, 査読有, 1: 41, 2012.

DOI: 10.1186/2193-1801-1-41

中野正和. 多因子疾患のゲノム医科学研究の動向, 京都府立医科大学雑誌, 査読無, 122: 745-755, 2013.

〔学会発表〕(計3件)

Nakano, M., Ikeda, Y., Tokuda, Y., Fuwa, M., Omi, N., Adachi, H., Ueno, M., Mori, K., Kinoshita, S. and Tashiro, 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. Nov. 6-10, 2012.

中野正和. ポストGWAS研究の動向. 遺伝子と緑内障 (パネルディスカッション). 第15回 Japan Glaucoma Council, 東京. 2013年12月14日.

中野正和. ゲノムワイド関連解析後の多因子疾患研究における次世代シーケンサーの活用法, CLC bioユーザーミーティング2013, 東京. 2013年5月27日.

〔図書〕(計1件)

池田陽子, 中野正和. 緑内障に関連する遺伝子. 緑内障診療クローズアップ. 木内良明 編. メジカルビュー社, 東京: pp6-11, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 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・大学院医学研究科  
・准教授  
研究者番号：70381944