

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293372

研究課題名(和文) 緑内障早期個別化医療の実現を見据えた進行速度を予測する血液RNAマーカー探索

研究課題名(英文) Research for blood RNA marker predicting prognosis of glaucoma focusing on the early and individualized medicine.

研究代表者

中澤 徹 (Nakazawa, Toru)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30361075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は眼圧依存性に視野障害をきたす眼疾患である。視野障害は不可逆性であるため、失明予防には早期発見、早期治療が必要である。今回我々は末梢血から得られるRNAの転写プロファイルターゲットとした緑内障を予測する新たなバイオマーカーを探索する研究を行った。本研究では正常眼圧緑内障患者32名とその対照として遺伝的要因が少ないと考えられる眼疾患患者32名を解析した。対象患者から末梢血を採取、RNAを抽出しCAGE法によるプロモーター発現量の網羅的解析を行った。2群のディファレンシャル解析より発現の亢進もしくは減少している遺伝子を選別した。これらは緑内障のバイオマーカーとして活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma is a chronic ocular disease that is often influenced by high intraocular pressure, resulting in irreversible loss of visual field. Visual field loss caused by glaucoma is progressive, thus, we should diagnose glaucoma at its early stages and start the treatment if indicated. The goal of the present study is to identify biomarkers for glaucoma, through investigating the translational profiles of RNA derived from blood. Thirty-two patients with normal tension glaucoma and 32 controls with ocular diseases which have little association with genetic factors were recruited in the present study. RNA was extracted from the peripheral blood. Activation of promoters of all the genes were comprehensively quantitated using cap analysis gene expression (CAGE) technique. We selected the candidate genes as biomarker according to the result of the differential analysis of the two groups. The promoters identified hold promise for their clinical application as biomarkers for glaucoma.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 RNA バイオマーカー CAGE法

1. 研究開始当初の背景

緑内障は不可逆的な視野障害をきたす慢性眼疾患である。緑内障が進行すると読書や運転などが困難になり日常生活の質が著しく低下する。我が国の中途失明原因第1位の疾患であり、超高齢化社会に伴いさらに有病率は増加するものと考えられている。

眼圧下降が唯一エビデンスのある治療だが、眼圧下降が十分に得られても視野障害が進行するケースも少なくない。さらに、眼圧下降治療の効果判定には長期的な経過観察を必要とするため、治療戦略の見直しが遅きに失することも多く、緑内障が失明疾患となる原因となっている。このような背景から、現在の緑内障診療には早期診断・予後を考慮した個別化医療(先制医療)、そして病態に基づいた新規治療薬の開発が求められている。これを踏まえて本研究では、予後を考慮した適切な治療を行うために、緑内障進行速度に相関する客観的な指標(バイオマーカー)を同定することを目標とする。緑内障の進行速度情報を鋭敏に反映するバイオマーカーを検査キットとして臨床導入出来れば、緑内障診療に個別化医療の概念が定着し、新たな治療ガイドラインの制定に繋がると期待できる。進行予測を可能にするバイオマーカーの探索として、他領域と同様にゲノム解析が挙げられる。しかし、疾患の発症リスク等を知ることはできるが、発症の有無、症状の進行といった疾患の現状を捉えることはできない。

我々は緑内障の病状をリアルタイムで反映するバイオマーカーの候補として、RNAに着目した。RNAの発現は状況に応じ変動するため、本研究で目的とする疾患の進行速度に相関するマーカーのバイオソースとして有望で更に蛋白質解析では得られない規模の網羅的な発現情報を取得できる利点がある。共同研究機関である理化学研究所では、世界に先駆けて独自開発したCAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 法により転写開始点等の網羅的なRNA情報を得ることに成功している。現状で得られる最良の視野進行速度RNAマーカーを同定するために、この先進技術を最大限に応用して緑内障治療下での疾患進行速度を反映したRNA情報を取得するとともに、バイオマーカーとして臨床応用を目指す。

2. 研究の目的

本研究においては血液由来のRNAを対象として正常眼圧緑内障の診断と病状進行を反映するバイオマーカーの確立を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 予備検討のCAGE解析で得られた緑内障非進行群16眼と進行群16眼のプロモーター別の活性からバイオマーカー候補の絞り込みを行う。絞り込みには、2群のディファレンシャル解析および緑内障進行速度に相関する遺伝子発現量から行う。

(2) バイオマーカー候補として選択した遺伝子はq-PCRを用いて定量化を試みる。q-PCRでの遺

伝子発現の定量化で、CAGE法での解析結果と同一のものが得られるか検証する。CAGE法の解析結果の妥当性が担保できた後に、緑内障別対象集団で再解析を行い、臨床応用の可能性を探る。また、バイオマーカー候補遺伝子と臨床的検査データとの関連解析を行い、臨床的意義をバイオマーカーごとに検討する。

(3) 今回解析した機知の緑内障性感受性遺伝子(CDKN2B-AS1、ABCA1、CAV2、SIX6、CDC/TGFBR3、FNDC3B、ATOH7)を調べ関連のあるプロモーターを調べる。

(4) 遺伝的素因の関連が少ないとされる非緑内障性疾患32例を対象にCAGE法による追加解析を行い、緑内障(32例)との活性化されたプロモーター量のディファレンシャル解析を行う。

4. 研究成果

予備検討よりすでにCAGE法により緑内障進行群16例、非進行群16例のディファレンシャル解析から、いくつかのバイオマーカー候補となる遺伝子の絞り込みを行い、さらに緑内障の進行速度と関連のあるものを選択した。

CAGE法により選択されたプロモーターはサンプルサイズの大きさから、検定力が小さく、また遺伝子のリファレンスジーン5'末端にないものも多くみられた。

次に、解析した緑内障患者の血液を用いq-PCRを行い妥当性の検証を行った(図1)。

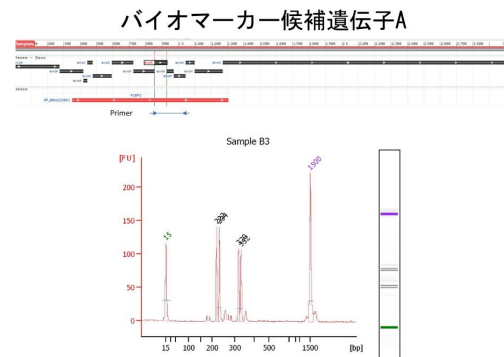


図1

結果、すべての候補遺伝子はバリエーションの問題から厳密な意味での定量化が難しくq-PCRを用いてバイオマーカーとしての臨床応用困難と考えられた。そこで研究計画の修正を検討し、研究計画の修正を行った(方法4)。

研究当初の目的では、緑内障進行速度を反映するバイオマーカーの探索であったが、高価なCAGE法による大規模な解析は困難であった。そこで修正案では、遺伝的素因の少ない対照疾患(白内障、黄斑円孔、黄斑前膜)32例から血液採取を行いCAGE法によるプロモーター別の活性の網羅的解析を新たに行った。対照群32例と緑内障群(進行群+非進行群)32例のディファレンシャル解析からバイオマーカー候補となる遺伝子を選別する方針とした。

また、この解析にあたり、対照群にも緑内障感受性遺伝子をもつ症例も多くいることが予想されたため、解析に先立ち、解析対象症例の緑内障

感受性遺伝子 (CDKN2B-AS1, ABCA1, CAV2, SIX6, CDC/TGFBR3, FNDC3B, ATOH7 の SNP) を調べた。対照群においても緑内障発症のリスクアレルを持つ症例が多く見られた。

対照群と緑内障群のプロモーター活性プロファイルに差異があるのか検証するためにクラスター分析および多次元尺度構成法 (MDS: Multi-Dimensional Scaling) を用いて評価した (図 2A, 2B)。

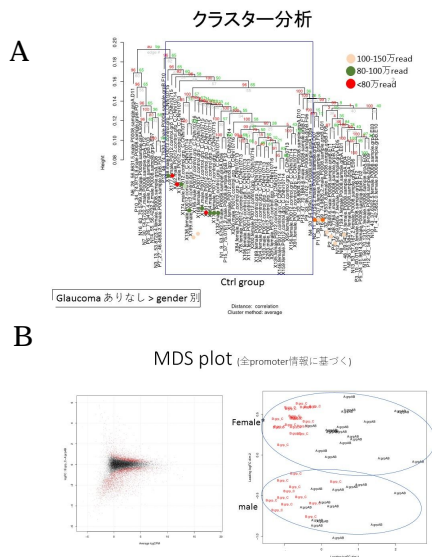


図 2

これらの解析では、CAGE 法による発現プロファイルは2群で異なり、プロモーターの活性で2群を分けられる可能性が示唆された。次に対照群と緑内障群のディファレンシャル解析を行い、緑内障群において、有意に発現が亢進、もしくは低下している遺伝子を選別した (図 3)。

発現変動promoter数のディファレンシャル解析

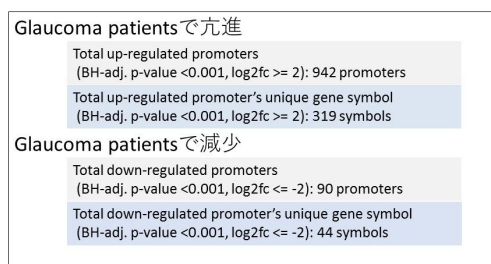
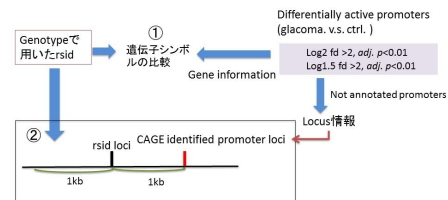


図 3

これらの遺伝子には酸化ストレス、成長、細胞死、細胞間接着分子などに関連する遺伝子が含まれていた。緑内障と酸化ストレスの関連はこれまで我々が緑内障モデル動物を用い、CAGE法やRNAシーケンスで網羅的に解析してきた研究成果 (BMC Genomics. 2014, Scientific report. 2016) と矛盾ないものであった。これらの遺伝子はバイオマーカーとして応用できる可能性があると考えられた。サブ解析としてディファレンシャル

解析結果で得られた遺伝子が緑内障感受性遺伝子 (CDKN2B-AS1, ABCA1, CAV2, SIX6, CDC/TGFBR3, FNDC3B, ATOH7 の SNP) に関連するか検討したが、一致性は見られなかった (図 4)。

SNP領域と発現変動promoterの関係



①、② 両調査とも、一致する関連性は得られなかった。

図 4

また、今回の解析では、CAGE 法による解析が緑内障群と対照群 2 回に分けられて行われた点に問題があり、CAGE 法による解析においてバッチ間にバイアスを生じている可能性が考えられた。そのため、初回解析した緑内障群のうち 7 検体を再解析してバッチ間の違いを検証した。2 回の CAGE 法による解析結果をクラスター分析で検討したところ、初回、2 回目のバッチ間ではクラスターを形成しなかった。また、スキャッタープロットでプロモーター活性のプロファイルと比較したところ、初回と 2 回目の解析結果に明らかな差を認めなかった。以上より、7 検体の 2 回の解析においてバッチ間の差異は小さく、CAGE 法の解析結果の比較は問題ないと考えられた。

今後は q-PCR を用いて、すでに得られたサンプルで再検証を行い、妥当性を確認する。さらに、別集団における解析において、緑内障の判別に有用であるか、臨床データと関連があるかどうか検証する。緑内障のバイオマーカーとしての臨床応用だけでなく、病態解明に向けて研究をさらに発展させていく。

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 4 件)

Yukita M, Omodaka K, Machida S, Yasuda M, Sato K, Maruyama K, Nishiguchi KM, Nakazawa T. Brimonidine Enhances the Electrophysiological Response of Retinal Ganglion Cells through the Trk-MAPK/ERK and PI3K Pathways in Axotomized Eyes. Current eye research. (査読有)42 巻 2017 年 125-133 頁. doi: 10.3109/02713683.2016.1153112.

Yasuda M, Tanaka Y, Omodaka K, Nishiguchi KM, Nakamura O, Tsuda S, Nakazawa T. Transcriptome profiling of the rat retina after optic nerve transection. Scientific report. (査読有)29 巻 2016 年.

doi: 10.1038/srep28736.

Fujita K, Nishiguchi KM, Yokoyama Y, Tomiyama Y, Tsuda S, Yasuda M, Maekawa S, Nakazawa T. In vivo cellular imaging of various stress/response pathways using AAV following axonal injury in mice. Scientific reports. (査読有)5 巻 2015 年 18141 頁. doi: 10.1038/srep18141.

Yukita M, Machida S, Nishiguchi KM, Tsuda S, Yokoyama Y, Yasuda M, Maruyama K, Nakazawa T. Molecular, anatomical and functional changes in the retinal ganglion cells after optic nerve crush in mice. Documenta ophthalmologica. (査読有)130 巻 2015 年 149-156 頁 . doi: 10.1007/s10633-014-9478-2.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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

中澤 徹(NAKAZAWA Toru)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号:30361075

(2)研究分担者

西口 康二(NISHIGUCHI Koji)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 30447825

河合純(KAWAI Jun)

国立研究開発法人理化学研究所・産学連携本部予防医療・診断技術開発プログラム・副プログラムディレクター

研究者番号: 30391923

國方 彦志(KUNIKATA Hiroshi)

東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 40361092

丸山 和一(MARUYAMA Kazuichi)

東北大学・病院・講師
研究者番号: 10433244

田中 佑治(TANAKA Yuji)

国立研究開発法人理化学研究所・情報基盤センター・研究員

研究者番号: 40625513

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

伊藤 昌可(ITO Masayoshi)
川路 英哉(KAWAJI Hideya)