

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462667

研究課題名(和文)エキソーム解析と細胞形質評価によるフックス角膜内皮ジストロフィの病因と病態の解明

研究課題名(英文) Revealing pathogenesis of Fuchs endothelial corneal dystrophy in Japanese by means of exome array

研究代表者

上野 盛夫 (Ueno, Morio)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40426531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、フックス角膜内皮ジストロフィ(Fuchs corneal endothelial dystrophy, FECD)の病因や病態の解明を目指し、日本人FECD患者55検体と対照群445検体による関連解析を実施した。その結果、既に白人で報告されているTCF4遺伝子上のバリエーションは日本人ではバリエーションではないことが判明した。一方、これまで報告されていない日本人固有のバリエーションが存在するFECD関連領域を第6番染色体上に同定することに成功した。

本研究成果は、人種間で発症機序が異なることが示唆されるFECDの病因/病態の解明に向けた基盤となる成果である。

研究成果の概要(英文)： In order to reveal the pathogenesis of Fuchs corneal endothelial dystrophy (FECD), we genotyped the samples derived from 55 Japanese FECD patients and 445 controls and performed association analysis.

As the results, a significant variant on TCF4 gene, which was previously reported to be associated with Caucasians, was turned out to be monomorphic in Japanese. In contrast, we succeeded in obtaining a locus at 6q15 with a significant variant that seemed to be specific to the Japanese FECD patients.

Consequently, the FECD-associated locus identified in this study should provide a basis for revealing not only the molecular mechanism of FECD pathogenesis, but also the different epidemiology and/or etiology of FECD arisen from different genetic backgrounds.

研究分野：眼科学

キーワード：フックス角膜内皮ジストロフィ 角膜内皮

## 1. 研究開始当初の背景

フックス角膜内皮ジストロフィ (Fuchs corneal endothelial dystrophy, FECD) は、原発性に角膜内皮が障害され、角膜内皮面に異常な細胞外マトリックスによる滴状の沈着物 (guttae) が生じる角膜内皮変性疾患である。進行すると角膜内皮細胞数の減少および浮腫により角膜が肥厚し、著しい視機能障害が惹起される。現状では角膜移植が唯一の治療法であるが、移植後の長期成績は不良であり、病因・病態の解明とそれに基づく新規治療法の開発が切望されている。

FECDの発症には遺伝的な寄与が考えられ、家族内発症例の遺伝形式からは常染色体優性遺伝と考えられているが、原因遺伝子の全貌は明らかになっていない。有病率が比較的高い欧米ではFECDの病因解明に向けて原因遺伝子の探索が積極的に行われており、角膜内皮細胞の基底膜の構成成分の一つである8型コラーゲンに関連するCOL8A2上のミスセンス変異がEarly-onset型FECD発症に関連すると報告されている (Biswasら, *Hum. Mol. Genet.*, 2001)。また、白人FECD患者におけるゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study, GWAS) ではTCF4のイントロン上にボンフェローニ補正による有意水準を超える一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が同定され (Baratzら, *N Eng J Med.* 2010)、加えてTCF4の別のイントロン上に存在する3塩基繰り返し配列 (CTGリピート) がFECD患者では有意に長いことも報告されている (Wiebenら, *PLoS One.* 2012)。一方、本邦ではEarly-onsetFECDの症例はほとんど報告されておらず、欧米では40歳以上の約5%の有病率と推計されるLate-onset型FECDも日本人では比較的に稀であることから、FECDの発症に関わる遺伝的寄与には人種差が存在し、日本人FECD患者では欧米人とは異なる遺伝的発症機構が存在していることが推察される。

研究代表者らは、これまでに日本人集団としては希少な50症例程度のFECD患者のゲノムDNAと臨床情報を現有している。さらに、10年以上にわたり実施している緑内障の遺伝学的な研究を通じて、本学医学倫理審査委員会の承認を得たFECDの研究にも使用可能な眼疾患を全く有しない12,000以上の正常コントロール検体についても同様に現有している。したがって日本人のFECD検体についても、網羅的な遺伝学的解析を可能とするケース・コントロール集団を現有している。

## 2. 研究の目的

人種間では有病率や遺伝的背景が異なることが推察されるFECD患者の病因や病態を解明するために、白人FECD患者のリスクマーカーとされるTCF4のマーカーSNPやCTGリピート長についても検証するとともに、遺伝子領域を重点的に解析可能なエキソームアレイデータに基づく関連解析により日本人FECD

患者に特有のリスクバリエーションの同定を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体収集

本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、本学の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会」の承認の下実施された。全被験者に対して本研究内容を説明し、同意を得た上で血液検体を採取した。被験者の診断は眼科専門医により実施された。FECDはguttaeの数および範囲により診断 (Krachmerら, *Arch. Ophthalmol.* 1978) し、正常コントロールは角膜内皮細胞数2,000 cells/mm<sup>2</sup>以上でguttaeの無い事を確認した。本研究では被験者の血液検体から核酸自動抽出装置 (BioRobot EZ1, キアゲン) を用いて溶出された高品質かつ均質なゲノムDNAを使用した。

### (2) 日本人FECD患者におけるTCF4上のCTGリピート長の検証

日本人FECD患者47検体および正常コントロール96検体のゲノムDNAを用いて、short tandem repeat (STR) アッセイによりTCF4上のCTGリピート長およびCTGの繰り返し数を検証した。STRアッセイにより単一シグナルが検出された検体については、サザンブロット法により両アレルのCTGリピートの長さを解析した。

### (3) ジェノタイプデータの取得と関連解析

日本人FECD患者および正常コントロール合計523検体分のゲノムDNAをInfinium HumanCoreExome-12 ver1.0 BeadsChip kit (イルミナ) にハイブリダイズすることで、総計538,448バリエーションに対するジェノタイプングを実施した。これらのデータに基づく関連解析を実施し、既報のリスク遺伝子TCF4周辺を精査するとともに、日本人FECD患者に特有のリスク領域を探索した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

日本人FECD患者におけるTCF4上のCTGリピート長 (Nakanoら, *IOVS*, 2015)

STRアッセイの結果、CTGを51回以上繰り返す配列を持つ検体は正常コントロールでは全く確認されなかったが、FECD患者では47検体中12検体 (26%, 表1) で検出され、白人同様、日本人のFECD患者においてもTCF4上のCTGリピートは有意に長いことが判明した。しかしながら、CTGを51回以上繰り返すFECD患者の割合は白人の79% (Wiebenら, *PLoS One.* 2012) に対して約1/3と明白な差があり、FECDの遺伝的背景が人種間で異なることを裏付ける結果が得られた。

表1. FECD患者および正常コントロールにおける度数分布

	CTGリピート数	
	≥51	≤50
FECD	12 (26%)	35 (74%)
コントロール	0 (0%)	96 (100%)

日本人FECD患者におけるエキソームアレイデータに基づく関連解析

エキソームアレイによるジェノタイプデータ取得後、ハイブリ不良、臨床情報不備、およびFECD患者と正常コントロールの全検体間に対するIBD-IBS解析結果に基づいた近親者の除外等による厳格な品質管理の下、最終的にFECD患者55検体、正常コントロール445検体の計500検体を厳選した。この検体集団を基に、ジェノタイプ成功のコールレート、マイナーアレル頻度、Hardy-Weinberg平衡検定結果により総計278,032バリエーションのジェノタイプデータを抽出した。

抽出されたジェノタイプデータに基づく関連解析の結果、白人においてFECD関連遺伝子として多数報告されている *TCF4* の周辺には有意なバリエーションが全く検出されなかった。特筆すべきことに、既報の白人GWASでFECDのリスクマーカーSNPとして同定されているrs613872は本研究結果ではリスクアレルが全く検出されなかった(図1)。これは、世界的な公共データベースであるNCBI dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)での日本人集団の傾向とも一致したことから、rs613872は日本人ではバリエーションではないことが判明し、白人集団の様にFECDのマーカーSNPとはなり得ない事が判明した。

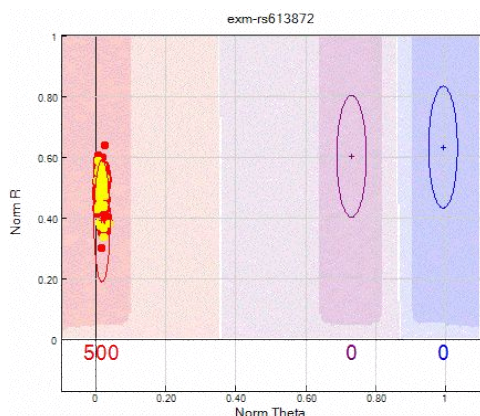


図1. FECD (黄) と正常コントロール (赤) 検体のrs613872のジェノタイプ。左側のホモ接合型のみ集中しており、中央のヘテロ接合型や右側のリスクアレルホモ接合型は全く検出されていない。

一方、第6番染色体上にボンフェローニ補正よりも更に厳しい有意水準として汎用されている閾値 ( $P < 5.0 \times 10^{-5}$ ) を超えるものを

含む、有意なバリエーションが集中する領域が検出された(図2)。さらに、最も有意なバリエーションは、FECDの病態評価に用いられる角膜の厚さ等の量的形質との関連性は認められなかったものの、NCBI dbSNPの情報から日本人と白人とではリスクアレルが逆転している興味深い事実が判明した。以上の事から、本研究により日本人と白人におけるFECDの遺伝的背景の違いを説明し得る新規のバリエーションを同定することに成功した。

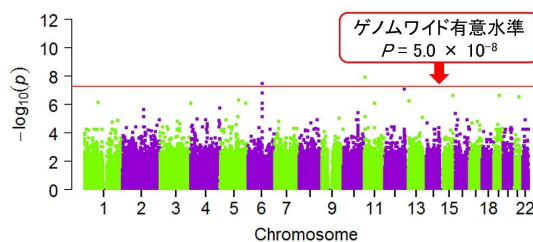


図2. エキソームアレイデータに基づくFECDの関連解析結果 (Manhattan Plot)

### (2) 国内外における位置づけとインパクト

本研究により、日本人FECD患者では *TCF4* との関連性が低いことが判明した一方、白人とは異なる疾患関連領域を同定した。これは従来推察されていた「FECDは人種間で異なる遺伝的背景を持つ」ことを裏付ける結果である。したがって、本研究により同定された新規FECD関連領域に関わる病因・病態が明らかにされることにより、本邦において術後の長期成績が不良な角膜移植のみに頼らざるをえないFECD患者に有用な治療法開発や創薬研究の発展が期待される。また同時に、本研究で同定されたバリエーションも含めたFECD関連バリエーションを活用する事で、従来よりも人種差やサブタイプ等を考慮した患者個人に最適化された診断・治療方針に対する選択肢を与える事が期待される。

### (3) 今後の展望

本研究により同定された日本人FECD患者に特有の領域を中心としたリシーケンス解析により、FECDの関連遺伝子または遺伝子発現調節領域等を特定し、人種間で異なるFECDの病因・病態を解明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1件)

Nakano M, Okumura N, Nakagawa H, Koizumi N, Ikeda Y, Ueno M, Yoshii K, Adachi H, Aleff RA, Butz ML, Highsmith WE, Tashiro K, Wieben ED, Kinoshita S, Baratz KH, Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene in Fuchs' Endothelial Corneal

Dystrophy in Japanese. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56, 4865-4869 (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

Ueno M, Nakano M, Nakagawa H, Adachi H, Tokuda Y, Ikeda Y, Sotozono C, Tashiro K, Kinoshita S. Genome-wide association study of Fuchs endothelial corneal dystrophy in a Japanese population. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Baltimore, USA (May 7-11, 2017).

足立博子, 徳田雄市, 中川紘子, 池田陽子, 上野盛夫, 外園千恵, 木下茂, 中野正和, 田代啓. 日本人フックス角膜内皮ジストロフィー患者の遺伝学的解析. 第6回同志社大学先端医工学研究センターシンポジウム, 京都 (2017年4月15日).

上野盛夫, 中野正和, 中川紘子, 足立博子, 徳田雄市, 池田陽子, 外園千恵, 田代啓, 木下茂. フックス角膜内皮ジストロフィーのゲノムワイド関連解析. 第121回日本眼科学会, 東京 (2017年4月7日).

足立博子, 徳田雄市, 中川紘子, 池田陽子, 上野盛夫, 外園千恵, 木下茂, 中野正和, 田代啓. 日本人 Fuchs endothelial dystrophy患者におけるゲノムワイド関連解析. 第39回日本分子生物学会年会, 横浜 (2016年11月30日-12月2日).

Nakano M, Adachi H, Tokuda Y, Nakagawa H, Ikeda Y, Ueno M, Sotozono C, Kinoshita S, Tashiro K. Genome-wide association study of Fuchs endothelial corneal dystrophy in a Japanese population. 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Vancouver, Canada (Oct. 18-22, 2016, poster).

Adachi H, Nakagawa H, Tokuda Y, Ikeda Y, Yoshii K, Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Kinoshita S, Nakano M, Tashiro K. Genetic study of Fuchs' endothelial corneal dystrophy in Japanese. 第3回同志社大学先端医工学研究センターシンポジウム, 京都 (2016年3月4日).

Nakano M. Genetics study of Fuchs' endothelial corneal dystrophy: What we have learned from glaucoma genetics study. 第1回同志社大学先端医工学研究センターシンポジウム, 京都 (2015年2月21日).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 盛夫 (UENO MORIO)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科  
・助教

研究者番号: 40426531

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科  
・教授

研究者番号: 30116024

(4) 連携研究者

池田 陽子 (IKEDA YOKO)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科  
・客員講師

研究者番号: 00433243

(5) 連携研究者

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

(6) 研究協力者

( )