

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861446

研究課題名(和文) 中心性漿液性脈絡網膜症に関連する遺伝子の解明

研究課題名(英文) Identification of genetic determinants associated with central serous chorioretinopathy

研究代表者

中西 秀雄 (NAKANISHI, Hideo)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80724278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：中心性漿液性脈絡網膜症(CSCR)は、黄斑部漿液性網膜剥離や脈絡膜厚肥厚などの特徴的所見を呈し、加齢黄斑変性(AMD)を続発し得る疾患である。

CSCRの発症に関連する遺伝子同定を目的に全ゲノム症例対照関連解析(GWAS)を行ったところ、VPS11遺伝子多型の関連が示唆されたが、追試で再現性は確認されなかった。次に黄斑部脈絡膜厚を質的形質とし、全ゲノム量的形質遺伝子座解析(QTL解析)を行ったところ、AMD疾患感受性遺伝子であるAMRS2/HTRA1遺伝子領域の関連が示唆された。CSCR類似の脈絡膜厚が厚いAMD症例では、通常のAMDに比べて、AMRS2/HTRA1遺伝子多型の寄与が低かった。

研究成果の概要(英文)：Central serous chorioretinopathy (CSCR) is characterized by serous detachment of central retina and diffusely thickened choroid, which can be complicated by age-related macular degeneration (AMD).

We performed genome-wide association study (GWAS) to identify genetic determinants associated with CSCR (250 cases/2,908 controls in the first stage and 143 cases/1,656 controls in the second stage). The first stage GWAS showed possible associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) nearby VPS11 gene at chromosome 11 and development of CSCR ( $P = 1.1 \times 10^{-8}$ ); however, the associations were not replicated in the second stage ( $P = 0.13$ ). We also performed quantitative trait locus (QTL) analysis using subfoveal choroidal thickness of 646 AMD cases. The QTL analysis suggested an association between ARMS2/HTRA1 gene locus and subfoveal choroidal thickness ( $P < 5.0 \times 10^{-8}$ ). The AMD subgroup with thickened choroid as CSCR showed lower genetic susceptibility to AMD than that of typical AMD.

研究分野：眼科

キーワード：中心性漿液性脈絡網膜症 全ゲノム関連解析 脈絡膜厚 一塩基多型

## 1. 研究開始当初の背景

中心性漿液性脈絡膜網膜症 (Central serous chorioretinopathy, CSCR) は、脈絡膜血管から漿液性成分の漏出が生じ、それが網膜下に貯留して黄斑部に漿液性網膜剥離をきたす眼科疾患である。黄斑部に漿液性網膜剥離を生じると、比較中心暗点や小視症をきたし、自然軽快したとしても変視症などの視覚的後遺症を残す。またしばしば遷延化し、黄斑部網膜の変性・萎縮から恒久的な視力障害をきたす (Yannuzzi LA. Am J Ophthalmol 2010;149:361-363.)。さらに近年、CSCR が、代表的な中途失明原因のひとつである加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration, AMD) を続発することも明らかになった (Fung AT, et al. Retina 2012;32:1829-37.)。このため、CSCR の発症や遷延化の原因解明が切望されている。しかし、CSCR の発症や、自然軽快せず遷延化する機序、AMD へ進展する機序などについては、未だ解明されていない。

また、CSCR では一般的に、黄斑部脈絡膜厚が通常よりも肥厚し、脈絡膜血管の透過性亢進を示唆する所見を高頻度に認めることが知られている。近年では黄斑疾患の発症と関連する脈絡膜の形状や循環動態についての報告がある (Mrejen S, Spaide RF. Surv Ophthalmol 2013;58:387-429, Jirarattanasopa P, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53:3663-72.)。しかし、CSCR 発症と関連する脈絡膜形状や循環動態という個人差が、どのようにして生じるかという点は、CSCR の発症原因と同様に、やはり明らかになっていない。

多くのありふれた疾患 (Common disease) には、環境因子と共に遺伝因子も関与する。特に眼科領域においては、AMD の発症に遺伝因子が非常に強く関与することが、ゲノム学的研究によって明らかになっている。ゲノム学的研究手技を用いて、CSCR の発症や予後、また脈絡膜厚に関与する遺伝子・分子を明らかにすることができれば、同疾患の発症機序解明、また臨床現場においては患者の予後予測が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず、CSCR 発症と関連する候補遺伝子座を、ゲノム学的手技である一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP) をマーカーとした全ゲノム領域網羅的 SNP 解析によって明らかにすることができるかの検討を行った。

また、CSCR では黄斑部の脈絡膜が通常よりも肥厚していることが報告されている。そこで、同部の厚みを光干渉断層計 (Optical coherence tomography, OCT) を用いて非侵襲的に測定・定量し、これを数的形質として用いて、同じくゲノム学的手技である全ゲノム領域の量的形質遺伝子座解析 (Quantitative trait locus 解析, QTL 解析) を行い、黄斑部の脈絡膜厚に関連する候補遺伝子座を同定することができるかの検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) CSCR、AMD 患者からの採血と DNA 抽出

京都大学眼科を受診した日本人の CSCR 患者および AMD 患者から、文書で同意を得て末梢血採血を行い、DNA 抽出キット (クラボウ社 QuickGene-610L) により DNA を抽出し保存した。本研究開始以前に、同様に同意書を取得し採血・DNA 抽出・保管を行っていた CSCR 症例・AMD 症例も、今回の検討対象に用いた。

### (2) CSCR 症例を対象とした、全ゲノム領域網羅的 SNP 解析

既取得および本研究期間中に新規に DNA サンプルを取得した CSCR 患者の臨床情報を後ろ向きに調査して 250 例を選定し、これらの症例由来の DNA を用いて、イルミナ社の全ゲノム網羅的 SNP 解析用マイクロアレイ (Illumina HumanOmniExpress BeadChip Kit) により、全ゲノム領域の約 700,000 個の SNP について遺伝子型を決定した。

全ゲノム関連解析において CSCR 発症と有意な関連が示唆された遺伝子領域については、再現性確認のために、上記とは別の CSCR 患者 143 例の DNA を用いて、該当する SNP の遺伝子型決定を、タックマン法によって行った。

### (3) 各症例群及び健常群での脈絡膜厚の定量

長浜コホート研究として、OCT を用いた黄斑部中心窩下脈絡膜厚データを有する一般健常日本人 1,194 例を用いて、脈絡膜厚と関連する遺伝子領域の検討を行った。関連の示唆された遺伝子領域については、再現性確認のために、京都大学眼科外来で取得された AMD 症例及び上述(2)の CSCR 症例の DNA と脈絡膜厚を用いて、遺伝子型と脈絡膜厚の関連を検討した。これらの脈絡膜厚は、通常の臨床検査として OCT により取得された黄斑部形状解析用画像を用いて、黄斑部中心である中心窩における脈絡膜厚の測定値を用いた。

具体的には、中心窩を通る黄斑部網脈絡膜 B スキャン画像を選定し、OCT 機器に内蔵されている画像解析用ソフトのキャリパー機能を用いて、網膜-脈絡膜境界線および脈絡膜-強膜境界線を手動で指定し、その境界線間の距離を症例毎に定量した。

#### (4) 統計学的解析

##### 全ゲノム症例対照関連解析

症例群としては、上述(2)の CSCR 症例における全ゲノム領域網羅的 SNP 遺伝子型決定を行った後、クオリティコントロールとしてマイナーアレル頻度 (Minor allele frequency, MAF) が 1%未満の SNP・遺伝子型決定成功率 90%未満の SNP は除外した。また、遺伝子型決定成功 SNP 頻度が 90%未満の症例も、検討から除外した。今回、PI-HAT を指標とした検討で血縁関係が疑われる CSCR 症例群はなかった。結果として、CSCR 250 例が以下の統計学的検討の症例群として選定された。

対照としては、先行研究で全ゲノム領域 SNP 遺伝子型決定がすでに行われている一般健常日本人 3,267 例のデータを用いた。これらの DNA は、イルミナ社の全ゲノム網羅的 SNP 解析用マイクロアレイ (Illumina Human610 Quad BeadChip, HumanOmni2.5-8 BeadChip, HumanOmni2.5-Quad BeadChip, HumanOmni2.5S-8, Infinium Exome-24 v1.0 BeadChip のいずれか 1 つ以上) により遺伝子型が決定されている。全ゲノム領域網羅的 SNP 遺伝子型決定を行った後、各チップからの SNP 遺伝子型を統合し、その後クオリティコントロールとして MAF が 1%未満の SNP、遺伝子型決定成功率 90%未満の SNP、遺伝子型決定成功 SNP 頻度が 90%未満の症例を除外した。また、PI-HAT を指標とした検討で血縁関係が疑われる症例も除外した。結果、一般健常人 2,908 例が以下の統計学的検討の対照群として選定された。

症例・対照群間で異なる解析用マイクロアレイを用いており、症例対照関連解析にて検討可能な SNP 数を最大化するため、症例群、対照群ともに、HapMap データベースに公開されている日本人データを基に、今回用いたイルミナ社マイクロアレイにのっていない SNP についても、imputation ソフトによる遺伝子型推定を行った。クオリティコントロール前で、8,421,388 個の SNP について統計学的検討を行なった。

各 SNP について、症例群と対照群との間で遺伝子型頻度に差があるかどうかを、コクランアーミテージの傾向検定 (Chi-square test

for trend) によって検討した。非常に多数の検定を行うことになるため、有意水準としては多重検定補正に準じ、ゲノムワイドレベルな有意水準として  $P$  値  $< 5.0 \times 10^{-8}$  と定義した。

ここまでの検討において、CSCR 発症とゲノムワイドレベルに有意な関連があることが示唆された SNP については、上記とは別の CSCR 患者 143 例を用いてタックマン法による遺伝子型決定を行い、再現性確認を行った。

##### 全ゲノム量的形質遺伝子座解析

CSCR 有無を質的形質とした上記 の解析と並行して、一般健常人 1,194 例、AMD 745 例、CSCR 250 例を検討対象とし、3-(3)で述べた方法で測定した黄斑部中心窩下脈絡膜厚を量的形質として、全ゲノム領域 SNP 遺伝子型情報を用いた QTL 解析を行なった。クオリティコントロールとしては と同様に、MAF が 1%未満の SNP・遺伝子型決定成功率 90%未満の SNP は除外した。また、遺伝子型決定成功 SNP 頻度が 90%未満の症例も検討から除外し、PI-HAT を指標とした血縁関係の検討も行なった。解析方法としては、一般健常人の QTL 解析でゲノムワイドレベルな有意水準 ( $P$  値  $< 5.0 \times 10^{-8}$ ) を満たす SNP に対して、CSCR 250 例及び AMD 745 例の QTL 解析結果を用いて、再現性の確認を行なった。

さらに、CSCR より多数の症例数を有し、CSCR と病態・疾患概念の一部重複が認識されつつある AMD 症例群 745 例に対しては、黄斑部中心窩下脈絡膜厚とゲノムワイドレベルで有意な相関が示唆された SNP について、以下の検討を追加した。AMD 症例を、脈絡膜厚がより厚くかつ脈絡膜透過性亢進を伴うような CSCR に近い臨床像をとる群と、そうでない群の 2 群に分類し、それぞれの群間で、患者背景や、病状経過・一般的に AMD に対して行われる抗 VEGF 薬硝子体注射後の治療効果や経過など、臨床情報の差異の有無を比較検討した。

##### 上記 における共通遺伝子探索

CSCR 有無を質的形質とした上記 、及び脈絡膜厚を量的形質とした上記 の個別の解析と並行して、 の両者に共通した関連を示す SNP の検討も行なった。これは、CSCR 症例において、疾患眼の脈絡膜厚の増加のみでなく反対眼の脈絡膜厚の増加も認められ、脈絡膜厚の肥厚自体が CSCR 発症と強く関連していると疑われるためである。各々の解析でゲノムワイドな有意水準を示した SNP に対して、もう一方の関連解析での再現性水準を  $P$  値  $< 0.05$  として検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) CSCR 症例を用いた全ゲノム症例対照関連解析について

今回、クオリティコントロールを通過した日本人の CSCR 250 例・一般健常日本人 2,908 例における 7,016,831 個の SNP について、遺伝子型頻度の差異を統計学的に検討した結果、ゲノムワイドレベルな有意水準とみなした P 値  $< 5.0 \times 10^{-8}$  を満たした SNP が 11 番染色体上に存在した (rs1177562;  $P = 1.1 \times 10^{-8}$ ; OR = 0.2; MAF = 0.11)。この SNP は、VPS11 (vacuolar sorting protein 11) と呼ばれる、網膜色素上皮細胞や視細胞など、CSCR の病態に重要な細胞の維持に関与する分子をコードしている遺伝子の近傍に存在しており、CSCR 関連 SNP 候補としては有望と考えられた。

一方で、AMD 発症への関与が報告されている、CFH 遺伝子領域 (1 番染色体) や HTRA1/ARMS2 遺伝子領域 (10 番染色体) などの複数の遺伝子領域における、CSCR 症例を用いた症例対照関連解析の検討も行った。AMD 発症とリスクを同じくする遺伝子領域は認めなかったが、CFH 遺伝子領域 I62V で、AMD 発症と関連する SNP において、有意に CSCR の発症が少なかった (rs800292;  $P=0.02$ )。この SNP に関しては、CSCR の症例対照関連解析で既報があり、同様の結果ではあるが、症例群の effect allele frequency が既報より小さく (0.53 対 0.47)、今後の症例数を増やしたさらなる検討が必要と考えられた。なお、今回調べた AMD 関連遺伝子の検討では、ゲノムワイドな有意水準を満たす関連を示さなかった。

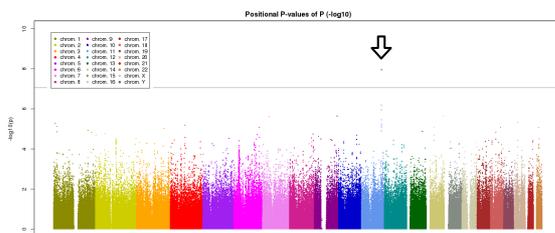


図 1. CSCR 症例を用いた全ゲノム症例対照関連解析のマンハッタンプロット。VPS11 遺伝子領域の rs1177562 がゲノムワイド水準で有意な関連を示している。

この結果を受けて、VPS11 遺伝子領域の rs1177562 を対象として、タックマン法による再現性確認を行った。上記とは別の CSCR 患者 143 例を症例群、一般健常日本人 1,656 例を対照群として再現性確認を行ったとこ

ろ、 $P = 0.13$  と再現性の確認は得られなかった。

今回の全ゲノム症例対照関連解析では、CSCR の発症に関連する遺伝子領域の同定には至らなかった。既報で AMD 発症への関与が繰り返し報告されている複数の遺伝子領域はいずれも CSCR 発症に有意には関連しなかったか、あるいは逆の方向への相関が確認されたことから、CSCR 発症と AMD 発症には異なる遺伝因子が関与している可能性が示唆された。

今後は、サンプル数を増やして統計学的検出力を上げ偽陰性を減らすなどの対策を検討し、ひきつづき CSCR 発症に関連する遺伝子領域の同定を目指す予定である。

##### (2) 脈絡膜厚を用いた全ゲノム量的形質遺伝子座解析について

今回、クオリティコントロールを通過した健常日本人 1,113 例における 7,008,604 個の SNP について、遺伝子型と脈絡膜厚との関連を統計学的に検討した結果、ゲノムワイドレベルな有意水準とみなした P 値  $< 5.0 \times 10^{-8}$  を満たした SNP は見られなかった。

続いて、クオリティコントロールを通過した日本人 AMD646 例における 585,961 個の SNP について、遺伝子型と脈絡膜厚との関連を統計学的に検討した。結果、ゲノムワイドレベルな有意水準とみなした P 値  $< 5.0 \times 10^{-8}$  を満たした SNP が 3 個あった。

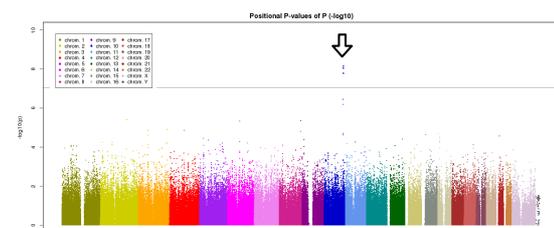


図 2. 脈絡膜厚を量的形質として行った全ゲノム量的形質遺伝子座解析のマンハッタンプロット。矢印の箇所が、既報で AMD 発症と非常に強い関連が繰り返し報告されている、HTRA1/ARMS2 遺伝子領域。

これらの領域の中には、既報で AMD 発症と非常に強い関連を持つことが多数報告されている HTRA1/ARMS2 遺伝子領域が含まれていた (図 2)。

この結果から我々は、AMD 発症に関連する遺伝子が、脈絡膜厚の量的形質にも関連する可能性を仮定した。先述の通り、日本人の AMD 発症に非常に強く関連する遺伝子座としては、HTRA1/ARMS2 遺伝子領域 (10 番染色体)

と、CFH 遺伝子領域 (1 番染色体) が知られている。

今回の QTL 解析の結果を受けて我々は、黄斑部中心窩下脈絡膜厚測定を行いつつ十分かつ比較的長期の臨床情報を有する AMD 症例 200 例を対象に、追加検討を行った。まずこの 200 例を、以下の条件で 2 群に分類した。「1 群」脈絡膜厚が両眼とも厚く ( $\geq 200 \mu\text{m}$ )、一般的な AMD に高頻度に認める前駆病変 (ドルーゼン) をほとんど伴わず、脈絡膜透過性亢進を伴う、臨床的には CSCR に近い症例群と、「2 群」上記以外の、典型的滲出型 AMD 症例群である。結果、200 例は 1 群が 39 例 (19.6%)、2 群が 161 例 (80.5 例) であった。

臨床情報としては、1 群 (似 CSCR 群) は中心窩下脈絡膜厚が  $310 \pm 53 \mu\text{m}$  であったのに対して、2 群 (典型的 AMD 群) では  $208 \pm 100 \mu\text{m}$  であった。診断時年齢は 1 群が  $68.7 \pm 9.0$  歳、2 群が  $75.6 \pm 8.3$  歳で 1 群 (似 CSCR 群) が有意に若く ( $P < 10^{-4}$ )、抗 VEGF 薬初回 3 回注射治療を受けた 108 眼で治療後経過を比較すると、その後に病変が再燃し注射追加を要するまでの期間が、1 群が 2 群に比べてより長かった (ログランク検定、 $p = 9.5 \times 10^{-3}$ ) など、両群間で臨床情報にも有意差が認められた。

この 2 群において、ARMS2 遺伝子領域を代表する SNP である rs10490924 と、CFH 遺伝子領域を代表する SNP である rs800292 について、アレル頻度の差異の有無を検討した。参考比較群として、既得の一般健常人 3,248 例の遺伝子頻度も用いた。その結果、ARMS2 遺伝子 rs10490924 多型の AMD 発症リスクアレルである T アレル頻度は、健常人で 36.5% であったのに対して、1 群 (似 CSCR 群) で 51.3%、2 群 (典型的 AMD 群) で 64.8% であった。さらに、CFH 遺伝子 rs800292 多型の AMD 発症非リスクアレルである A アレル頻度は、健常人で 40.5% であったのに対し、1 群 (似 CSCR 群) で 41.0%、2 群 (典型的 AMD 群) で 25.5% で、1 群と 2 群の間に有意差を認めた。

以上より、CSCR に近い臨床像を呈する 1 群では、代表的な AMD 疾患感受性遺伝子である CFH I62V と ARMS2 A69S 遺伝子多型が日本人の AMD よりも正常対照者に類似していることが示された (下表)。

	症例数	ARMS2 A69S (rs10490924)				P値
		GG	GT	TT	Tアレル頻度	
健常群	3,248	1,312	1,499	435	36.5%	-
1群 (似CSCR群)	39	11	16	12	51.3%	0.29
2群 (典型的AMD群)	161	24	64	71	64.8%	

表 1. 似 CSCR 群と典型的 AMD 群における、ARMS2 遺伝子 rs10490924 多型頻度。

	症例数	CFH I62V (rs800292)				P値
		AA	AG	GG	Aアレル頻度	
健常群	3,248	546	1,538	1,162	40.5%	-
1群 (似CSCR群)	39	8	16	15	41.0%	0.013
2群 (典型的AMD群)	161	17	48	96	25.5%	

表 2. 似 CSCR 群と典型的 AMD 群における、CFH 遺伝子 rs800292 多型頻度。

以上の結果から、典型的 AMD 発症に強く関与する ARMS2 遺伝子や CFH 遺伝子は、CSCR あるいは CSCR に似た臨床像を呈する AMD 症例においては、発症における寄与は高くないことが示唆された。

今回は比較的少数例での検討であり、今後、症例数を増やして同様の検討を行い再現性確認を行う予定である。また、CSCR だけでなく CSCR に似た臨床像を呈する AMD 症例も加えて全ゲノム症例対照関連解析を行い、これらの症例群発症に関与する遺伝子座の同定を目指す予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

吉村 長久, 板谷 正紀, 辻川 明孝, 大谷 篤史, 山城 健児, 大音 壮太郎, 武蔵 国弘, 平見 恭彦, 上田 奈央子, 岩間 大輔, 宇佐見 有子, 大石 明生, 尾島 優美子, 亀田 隆範, 中西 秀雄, 佐々原 学, 中川 聡子, 林 寿子, 仲田 勇, 赤木 由美子, 三宅 正裕, Jirarattanasopa Pichai, Ellabban Abdallah, 黒田 能匡, 高橋 綾子, 畑 匡侑, 若園 知尊, 吉川 宗光, 田村 寛, 松田 文彦, 山田 亮, 後藤 謙元  
日本人の加齢黄斑変性  
日本眼科学会雑誌、査読有、120 巻、2016、Page163-188

Miyake M, Ooto S, Yamashiro K, Takahashi A, Yoshikawa M, Akagi-Kurashige Y, Ueda-Arakawa N, Oishi A, Nakanishi H, Tamura H, Tsujikawa A, Yoshimura N. Pachychoroid neovascularopathy and age-related macular degeneration. Sci Rep. 査読有、2015、6;5:16204.

〔学会発表〕(計 1 件)

加齢黄斑変性と Pachychoroid Pigment Epitheliopathy の関連  
三宅正裕、大音壮太郎、辻川明孝、山城健児、大石明生、田村寛、中西秀雄、上田奈央子、赤木由美子、畑匡侑、吉川宗光、高橋綾子、

吉村長久

第 53 回日本網膜硝子体学会総会、2014 年、

大阪

〔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〕特記事項なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

中西 秀雄 (NAKANISHI, Hideo)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：8 0 7 2 4 2 7 8

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし