

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592562

研究課題名(和文) 新たな視点からの緑内障発症遺伝要因の追究：ゲノムコピー数多型(CNV)の解析

研究課題名(英文) Investigation for the genetic factor of glaucoma in another viewpoint: an analysis of possible involvement of copy number variation (CNV) in genome

研究代表者

蓑島 伸生 (Minoshima, Shinsei)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授

研究者番号：90181966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の原発性開放隅角緑内障(POAG)発症へのゲノムコピー数多型(CNV)の関与を調べるために、同疾患34家系44名のDNA検体について、マイクロアレイを用いて解析した。検出された1195種類のCNVのうち、遺伝子に影響があつて、患者に特異的な新規のまたは稀少なCNVが8箇所(欠失：6箇所、重複：2箇所)見つかった。欠失箇所には計7遺伝子、重複箇所には計5遺伝子が含まれていた。これら計12種類の遺伝子は欠失または重複によりPOAGの発症の原因となる、あるいは他遺伝子の異常とともに発症を修飾する可能性があり、さらに検討を継続している。

研究成果の概要(英文)：To detect the genomic copy number variation(s) (CNV) which affect the onset of primary open-angle glaucoma (POAG), 44 members from 34 families with the disease were subjected to the microarray assay. Of 1195 CNV loci found, 8 (6 sites of deletion and 2 of duplication) of patients-specific ones were novel or very rare and considered to change the dosage of gene. Deletion loci contained 7 genes and duplication ones 5 genes. These 12 genes possibly cause POAG by the abnormal increase or decrease of gene copy number.

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼遺伝学

キーワード：開放隅角緑内障 正常眼圧緑内障 コピー数多型 CNV ゲノムワイド解析 マイクロアレイ 欠失 重複

1. 研究開始当初の背景

緑内障は日本国民の中途失明の最大原因であり(厚生労働省, 2005) そのうち最も頻度が高いのは開放隅角緑内障(Primary open-angle glaucoma, POAG)である。POAG(本報告では、高眼圧、すなわち狭義の開放隅角緑内障と正常眼圧緑内障を合わせたの呼称とする)は遺伝要因がかなり大きく、家族性の症例は緑内障全体の30~50%とも報告されている。これまでに、リンケージ解析により16の遺伝子座が候補領域としてマッピングされている。そのうち、3領域については比較的早くから原因遺伝子(ミオシリン、オプチニューリン、WDR36)が知られていたが、最近新たにニューロトロフィン4とASB10が同定された。しかし、全POAG症例の中では、これらの遺伝子に変異がある症例は多くはない。オプチニューリン、ミオシリンについては、それぞれの初報では家族性症例の5~10%に変異が見つかることが報告されたが、後の報告では、より低い変異頻度が示された。当然、国や民族による違いも大きいと考えられるが、日本人症例でも状況は同様であり、家族性に発症する大半のPOAG症例の遺伝要因は未知である。しかし、いわゆるCommon Disease(生活習慣病など)よりも遺伝の寄与が大きいので、未知の原因遺伝子が存在すると考えられる。しかし、リンケージ解析による残り11箇所のゲノム領域を含めて原因遺伝子の数が多いこと、さらに修飾遺伝子、易罹患性遺伝子等の寄与も想定され、それらが家系によって異なる組み合わせで関与することが遺伝要因研究を困難にしていると推察できる。このような観点で、我々は緑内障の新たな遺伝要因を探索している。

ゲノム塩基配列決定プロジェクトの成果の一つとして、「ゲノムの多くの座位で、長い(数キロ~数百キロ塩基対)領域にわたって、そのコピー数が、個人により、あるいは一個人の相同染色体間で異なる」ことがわかってきた。この現象は、ゲノムコピー数多型(Copy Number Variation, CNV)と呼ばれている。CNVの領域に遺伝子が含まれることは珍しくない。コピー数が“2”であることが重要な遺伝子はCNVによりコピー数が増減することで、異常な表現型につながり、疾患の原因となり得る。実際、CNVという名称で提唱されるより前から、多くの疾患(ディジョージ、ウィリアムズ、アンジェルマン等の症候群など)が、ゲノムの特定の領域のコピー数の異常で起きることがわかってきた。一方、正常なヒトゲノム中にCNVは少なくとも1400箇所以上あることが2006年に報告され(Redon, Nature 444:428, 2006)、最新のデータベース上では15,000箇所以上が記載されている。これらのCNVの多くは、“common”なもので、common CNVの大半は疾患原因とはならないと考えられるが、ある種の個人差(疾患の易罹患性や薬剤反応性等)に関連している可能性は十分考えられる。現在は、マ

イクロアレイ技術等の発達により、CNVの検出をゲノムワイドで比較的容易に行うことができるので、種々の疾患に関連するCNVの報告が多数なされ始めている。その一例として自閉症、統合失調症などの精神疾患で特定のCNV(commonおよび*de novo*の両方)が発症と有意な関連を示す報告が複数なされた緑内障患者にも、疾患に関連するCNVが存在する可能性が十分に考えられるが、ゲノムワイドのCNV解析は未だ世界で報告がない。

我々は緑内障の克服のために発症機構を追究している。これまで多数例の遺伝性眼疾患の遺伝子研究の経験を有する研究分担者堀田は、家族歴のある開放隅角緑内障および正常眼圧緑内障症例の収集を継続している。現在までに69家系(患者数163)の情報を収集し、116症例について検体を取得した。これらの家系を用いて、既知の3種の原因遺伝子の変異の有無、新たな原因遺伝子探索のための連鎖解析等を進めている。しかし、これらの緑内障家系は、家族性は明確であるが、遺伝形式は不明瞭な場合が多い。我々は、緑内障の未知の遺伝要因の一つとして、CNVを検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々の研究組織で収集を継続している緑内障家族性症例に対して、緑内障関連CNVの同定を目指した解析を行うことである。

3. 研究の方法

CNV解析には、180万種のDNAマーカーを搭載したゲノムワイドヒトSNP Nsp/Sty 6.0アレイ(Affymetrix社)を用いた。同アレイのDNAマーカーは906,600の1塩基多型(SNPs)と946,000のプロープからなり、CNVを鋭敏に検出可能である。末梢血からQIAamp DNA Blood Maxiキットを用いてDNAを抽出し、上記マイクロアレイのメーカーのプロトコルに沿って、濃度50ng/ μ lに調製した。250ngのDNAをNsp IおよびSty Iで個別に消化し、それぞれの消化物に特異的なアダプターをDNAリガーゼで連結した。アダプター上の塩基配列に対応するプライマーを用いてDNAを増幅した。増幅産物の長さが200~1100塩基対になるように条件を設定した。それぞれの制限酵素消化による最終PCR産物を混合してDNase Iで断片化し、末端をピオチン標識してから、マイクロアレイにハイブリダイゼーションした。標識ピオチンにフィコエリスリン標識ストレプトアビジンを結合させ、各マーカーへのDNAのハイブリダイゼーションを定量した。解析ソフトウェアとしては、Affymetrix社の供給する標準的システムに加えて、ペンシルバニア大学のPennCNVも用いた。

4. 研究成果

収集した家系を精査し、複数の緑内障患者

を含む 14 家系を選定した。ほとんどの患者は POAG を呈していたが、ごく一部は正常眼圧緑内障 (NTG) であった。患者と同胞を含めて 30 個体を解析対象とした。

まず、最大の 1 家系について家系解析を行った。発症者 6 名中 3 名 (それぞれ POAG、正常眼圧緑内障 (NTG)、高眼圧症) で共通に *PARK2* 遺伝子の片側アレルに全く同じ 1,872 bp の欠失が見られた。残り 3 名の発症者 (2 名は POAG、1 名は NTG)、及び同家系内の非発症者 3 名には同 *PARK2* 欠失は見られなかった。さらに、同家系では、2 名の患者で *DISC1* 遺伝子領域に 10~14 kb、別の 2 名の患者で *INST4L1* 遺伝子領域に 470~513 kb の欠失が片側アレルに検出された。これらの欠失も、同家系内の非発症者には見られなかった。1 名の患者は、これら 3 座位を全て欠失していたが、別の 1 名の患者は *PARK2* と *DISC1* を欠失していた。*INST4L1* のみ、及び *PARK2* のみを欠失している患者も各 1 名見られた。総合的に判断した結果、これらの CNV (3 遺伝子領域の欠失) と緑内障の発症に関連があるとは言えないと考えられた。

表 1. POAG患者で見つかった極稀または新規のCNV

検体番号	家系番号	染色体	座位	塩基番号	領域内ブロープ数	領域長 (kb)	コピー数	領域内遺伝子
POAG 2-23	K018	2	q22.1	137581762-137593736	20	11.9	1	THSD7B
POAG02_9	K009	2	p14	68168158-68418154	142	250	3	CNRIP1, PNO1, PPP3R1, WDR92
POAG02_42	K036	6	p25.3	1891509-1987139	63	95.6	1	GMDS
POAG02_16	K014	7	p21.3	12284169-12465360	120	181.1	3	VWDE
POAG 2-31	K026	7	q35	143778555-143848989	54	70.4	1	TPK1
POAG 2-10	K006	7	q11.21	64231500-64744239	222	512.7	1	INTS4L1, ZNF92
POAG 2-6	K006	7	q11.21	64274563-64744239	216	469.7	1	INTS4L1, ZNF92
POAG02_26	K021	9	q21.11	72398743-72426615	23	27.9	1	TRPM3
POAG 2-31	K026	11	p14.1	28105472-28269673	69	164.2	1	METTL15

次に、収集した中から 34 家系、44 名 (POAG 37 例、正常眼圧緑内障 1 例、高眼圧症 2 例、非発症者 4 例) の DNA 検体について CNV を解析し、正常対照として、それら 34 家系とは無関係の 158 名の検体を用いて、症例対照研究 (case-control study) を行った。37 例の POAG から合計 1195 種類の CNV が検出され、うち 595 については、遺伝子に影響 (エクソンの欠失あるいは重複) のあることが判明した。CNV の平均サイズは 169.4 kb であった。POAG 患者と正常対照で、検出した CNV の総数、1 例あたりの平均 CNV 数、欠失 CNV 数、重複 CNV 数、CNV サイズに有意な差はなかった。しかし、POAG 患者に特異的な極稀 (DGV データベース中に 0.1%以下の存在率)、または新規の CNV で、遺伝子に影響のあるものが 8 種類見つかった (表 1)。それらのうち、欠失については、6 本の染色体に分散しており、最小のものは 2 番染色体上 11.9 kb の欠失 (1 遺伝子に影響)、最大のものは 7 番染色体上 512.7 kb の欠失 (2 遺伝子) であった。重複については、2 本の染色体に位置しており、うち一つは 2 番染色体上の 250 kb 領域の 4

遺伝子に影響していた。これらの 8 箇所の CNV は、これまでにリンケージ解析により明らかにされた 16 の候補遺伝子領域とは、座位が異なっていた。現在、上記 8 種類の極稀または新規の CNV 中の遺伝子と緑内障発症の関連を詳細に検討している。

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 9 件)

- Gao J, Ohtsubo M, Hotta Y, Minoshima S. Oligomerization of Optineurin and Its Oxidative Stress- or E50K Mutation-Driven Covalent Cross-Linking: Possible Relationship with Glaucoma Pathology. *PLoS ONE* in press. (査読有)
- Wang C, Hosono K, Ohtsubo M, Ohishi K, Gao J, Nakanishi H, Hikoya A, Sato M, Hotta Y, Minoshima S. Interaction between optineurin and the bZIP transcription factor NRL. *Cell Biol Int* 38:16-25, 2014, doi: 10.1002/cbin.10174 (査読有)
- Suto K, Hosono K, Takahashi M, Hirami Y, Arai Y, Nagase Y, Ueno S, Terasaki H, Minoshima S, Kondo M, Hotta Y. Clinical Phenotype in Ten Unrelated Japanese Patients with Mutations in the EYS Gene. *Ophthalmic Genet* 35:25-34, 2014, doi: 10.3109/13816810.2013.768673 (査読有)
- Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. *PLoS ONE* 7:e31036, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031036 (査読有)
- Thanseem I, Anitha A, Nakamura K, Suda S, Iwata K, Matsuzaki H, Ohtsubo M, Ueki T, Katayama T, Iwata Y, Suzuki K, Minoshima S, Mori N. Elevated transcription factor specificity protein 1 in autistic brains alters the expression of autism candidate genes. *Biol Psychiatry* 71:410-418, 2012, doi: 10.1016/j.biopsych.2011.09.020 (査読有)
- Nojima K, Hosono K, Zhao Y, Toshiba T, Hikoya A, Asai T, Kato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Clinical features of a Japanese case with Bothnia dystrophy. *Ophthalmic Genet* 33:83-88, 2012, doi: 10.3109/13816810.2011.634877 (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

無し。

6. 研究組織

(1)研究代表者

菟島 伸生 (MINOSHIMA SHINSEI)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授

研究者番号：90181966

(2)研究分担者

大石 健太郎 (OHISHI KENTARO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・助教

研究者番号：80345826

大坪 正史 (OHTSUBO MASAFUMI)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・助教

研究者番号：10327653

イスマール サンシーム (ISMAIL THANSEEM)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・特任研究員

研究者番号：60569846

堀田 喜裕 (HOTTA YOSHIHIRO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：90173608

(3)連携研究者

無し。