

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10879

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた加齢黄斑変性類縁疾患の疾患感受性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Exome-wide Association Study for Subtypes of Age-related Macular Degeneration

研究代表者

森 圭介 (Mori, Keisuke)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：90251090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)は先進国における成人の中途失明の主要原因であり、高齢化社会における社会問題となっている。AMDの発症には、喫煙や肥満などの性格環境因子の他に、遺伝的素因が複合的に関与することが明らかとされてきた。一方、AMDのサブタイプである、ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)と網膜血管腫状増殖(RAP)については不明であった。研究代表者らは、国際共同研究に参画し、PCVに特異的に関連する遺伝子として、FGD6を報告し、その機能解析から脈管形成に関連がある因子であることを示した。現在RAPについても症例を重ねて検索中である。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of blindness of elderly people in the developed countries. It is a complex disease with multiple specific genes and environmental risk factors. However, specific susceptible genes have been relatively unknown for two distinct subtypes of AMD, polypoidal choroidal vasculopathy and retinal angiomatous proliferation. The representative of this study participated in international joint research and found that a missense variant in FGD6 confers increased risk of PCV. FGD6 also promotes more abnormal vessel development in the mouse retina model. A genetic association study with RAP is currently under way.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 網膜血管腫状増殖 reticular pseudodrusen ポリープ状脈絡膜血管症 遺伝子解析
遺伝子多型 エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD)は、欧米では中途失明原因の第一位であり、本邦においても罹患者数が急増し、高齢化社会における社会問題となっている。AMDの発症には、肥満や喫煙など、生活環境による影響が考えられるとともに、遺伝的素因が複合的に関与することが明らかとされてきた。2005年に、補体代替系制御因子の1つである1番染色体上の補体H因子(CFH)の一塩基多型(SNP)が、AMDの発症と強く相関することが報告された。第2のAMD関連遺伝子座として、10番染色体長腕10q26領域に位置する加齢黄斑症感受性遺伝子ARMS2とセリンプロテアーゼ遺伝子HTRA1のSNPとAMDの関連が示された。申請者らは独自にAMD罹患者および非罹患者のSNP解析を行い、日本人においてもCFH多型および10q26領域がAMD発症と強く相関する事を明らかにしてきた。特にHTRA1遺伝子プロモーター上のSNP(-512GA)については、日本人におけるAMD相関性を明らかにし、NCBIホームページ上のヒト遺伝データベースOMINにも引用されている(Mori K, et al., *J Hum Genet* 52: 636, 2007)。また、CFH多型とHTRA1多型を組み合わせることにより、AMD罹患者リスクを高率で予測できることも見出し(Mori K, et al., *Ophthalmology* 117: 92, 2010)、AMDの治療法である、光線力学療法の効果予測にも有効であることを明らかにした(Tsuchihashi T, Mori K, et al., *Ophthalmology*, 118: 93, 2011; 右下挿入図)。これに加え、申請者らは理化学研究所、九州大学との共同研究にて、日本人AMDのマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析(GWAS)を行い、新規遺伝子を二つ同定した(Arakawa S, Mori K (他 18名, 11番目), *Nat Genet* 43: 1001, 2011)。

上述の遺伝子座の他に、申請者らはAMD発症において重要とされている生活環境因子においても、喫煙および長鎖不飽和脂肪酸分画の関与が日本人のAMD特性を形成していることを報告した。具体的には、多重解析とロジスティック回帰分析を用い、日本人のAMDが男性に多いのは生物学的な理由ではなく、男性に喫煙者が多いことによる交絡バイアスであることを示し、また ω -3、 ω -6長鎖不飽和脂肪酸を含むすべての脂肪酸の濃度は、AMD患者、対象患者ともに理想的な値であり、欧米の報告との違いを明らかにした。加えて、これらの環境因子の影響もオッズ比では遺伝子座として重要とされているCFHやHTRA1とほぼ同等であることを示した(Kabasawa S, Mori K, et al., *Ophthalmology*, 118: 1082, 2011)。これは日本人AMDへの生活環境因子のかかわりが遺伝子座とほぼ同様に重要であることを示し、かつ、長年の疑問であった日本人におけるAMD発症の性差についての科学的な説明をした初めての論文である。

前述のように、AMDそのものの発症に関与する疾患感受性遺伝子および生活環境因子は、「次世代シーケンサーを用いた解析により初めて検出される」未知の疾患感受性遺伝子を除き、概ね同定されたと考えられる。一方、AMDには前駆病変およびいくつかのサブタイプがある。AMDの前駆病変として一般的なsoft drusenの他に、近年特に注目されているものに、reticular pseudodrusen (RPD)がある。Soft drusenは色素上皮下に存在するのに対し、RPDは色素上皮上にあり、またサブタイプのひとつである網膜血管腫状増殖(RAP)に高頻度に合併すると報告されている。AMDのサブタイプには、RAPの他に典型AMDとポリープ状脈絡膜血管症(PCV)がある。PCVは特に東アジア人種に多いとされており、文献によっても異なるが、総括すると典型AMD・PCVがそれぞれ約半数で、RAPは全体の残りおよそ5%を占めるとされている。RAPは典型AMD、PCVと比較しHTRA1/ARMS2において特に強い関連があることが示されたが(Hayashi H, et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 5914, 2010; Tanaka K, et al., *Mol Vis* 17:2751, 2011)、いずれの報告も既知の遺伝子座を検索したもので、網羅的に解析したものではない。また、典型AMDとPCVとは臨床的には似て非なるものであり、その遺伝的背景を同定することは、病態の理解の上で極めて有用な情報となることは間違いない。

2. 研究の目的

「1 研究開始当初の背景」の項で述べた様に、PCRによる候補遺伝子の解析やGWASによる網羅的解析に関しては、既に多くの研究者の研鑽により、一定の成果が挙げられている。一方、近年次世代シーケンサーが登場し、ゲノムをリシーケンスして疾患の原因となる変異を探索する研究がはじまり、国際癌ゲノムコンソーシアムのように全ゲノムを対象として点変異、転座、増幅&欠失変異を探索するプロジェクトが広まる一方で、全ゲノムの約1%に相当するエクソンのみを解読し、効率よく疾患原因遺伝子を探索するエクソーム解析の手法が注目されてきている。この方法の長所としてゲノムの約1%のみを対象とするため、シーケンスのコストが大幅に低減でき、また産出されるデータ量も少ないため、比較的データ解析も取扱いやすく、またその解釈も容易であるとされる。一方短所としては蛋白質をコードする領域以外の遺伝子変異や構造変異を拾えないことが挙げられている。

このような背景の下、本研究においては、AMDの前駆病変とサブタイプについて、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を行い、これらの病態における新規疾患感受性遺伝子を同定することを目的とする。具体的には、RAP、RPDの各病態についてサンプルを採取し、エクソーム解析により、関連遺

伝因子の詳細な検索を行う。加えて、倫理委員会の承認の下、積極的に共同研究体制を形成し、ゲノムサンプルおよびシーケンスデータのやり取りを行い、特に他のサブタイプとの違い、つまり、典型 AMD と PCV との遺伝学的な相違点について、相加的・相補的なデータ集積や発表を行う。これは今までその詳細な病因が不明であった上述の疾患の病態解明に寄与するものであり、予防医学や治療法の開発に役立つ新たな知見を提示するものと考えらる。

3. 研究の方法

(1) 埼玉医科大学および国際医療福祉大学の倫理委員会の承認の下、文書にて同意を得られた以下の疾患の罹患者、その血縁兄弟姉妹および非罹患者より採血を行い、ゲノム DNA 精製を行う。

対象疾患名：

加齢黄斑変性 (AMD; ただしその サブタイプである RAP を含む)

Reticular Pseudodrusen (RPD)

(2) 臨床データとして、疾患名、性別、年齢、罹患眼 (片眼性・両眼性)、フルオレセイン・インドシアニングリーン蛍光眼底造影所見、光干渉断層像所見、疾患眼の Drusen の性状、片眼性の場合他眼の Drusen の性状および AREDS/CARMS grading、網膜色素上皮剥離の有無、BMI (身長・体重)、喫煙歴 (pack・year)、糖尿病・高血圧・心血管病変等の既往について調査する。これは兄弟姉妹についても同様に調査する。

(3) ゲノムデータベース情報 (Database of Genomic Variants、dbGaP データベースの米国 Age-Related Eye Disease Study などの AMD の GWAS 情報) および申請者グループが独自に行ってきた GWAS データ(「加齢黄斑変性症の発症リスクの予測方法」特願 **2007-194922**) を活用し、AMD 関連 SNP のうち特に疾患感受性の高い遺伝子について、

基本的な遺伝情報として、PCR を行い Genotyping を行っておく。

(4) サンプルが相当数集積した時点で、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行う。SNP については、HapMap データベースの他、京都大学を中心としたエクソーム解析に関する 1000 人規模の日本人遺伝子変動データベースと比較し、既知の AMD 疾患感受性遺伝子以外にも罹患者群で有意に変動する変異に注目し、臨床データと合わせて統計学的に解析する。具体的には、疾患の有無や上述の - の点だけでなく、視力および治療を行った場合はその予後 (中心窩網膜厚の変化等) も含める。

特に、次世代シーケンス解析により同定が可能になる稀少頻度のアミノ酸変異に着目し、典型的 AMD における遺伝子型頻度と比較しながら、RAP, RPD におけるこれら疾患感受性遺伝子の病態生理学的意義および診断的価値について検討を行う。

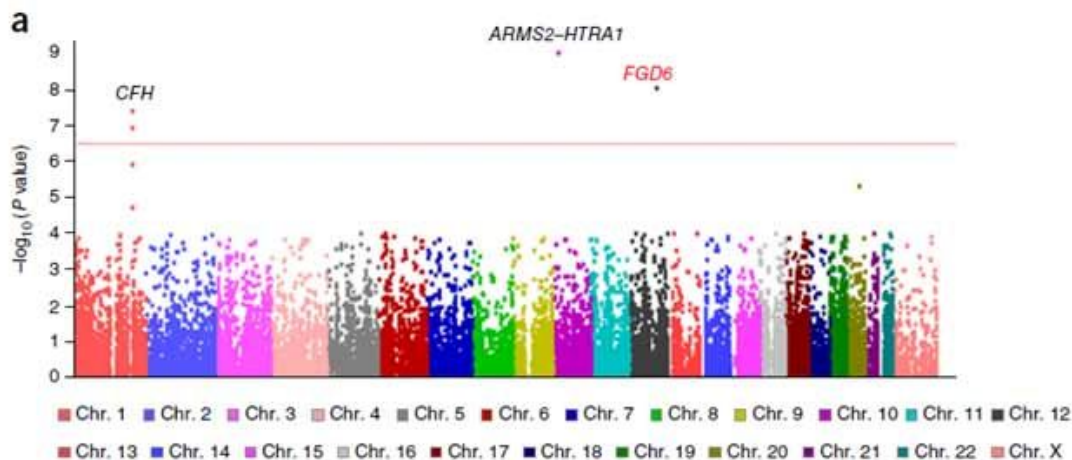
加えて、倫理委員会の承認の下、積極的に共同研究体制を形成し、ゲノムサンプルおよびシーケンスデータのやり取りを行い、相加的・相補的なデータ集積や発表を行う。

4. 研究成果

(1) AMD の各サブタイプ間の疾患感受性遺伝子の検索：典型 AMD と PCV の比較

典型 AMD と PCV は、脈絡膜新生血管の形態が異なるが、ともに脈絡膜新生血管は網膜下に存在し、新生血管自体が脈絡膜毛細血管板であること、ともに HTRA1/ARMS2、CFH との関連が強いことなど、臨床的にも遺伝学的にも類似点が多く、遺伝子解析には一万検体以上のサンプルが必要となる。そのため、結果的にかなり大型の国際共同研究 (中国、シンガポール、韓国、中国、日本の東アジア人種を対象としたもの) に参画することになり、その結果は、**Nat Genet** に報告された (5. 主な発表論文等; 雑誌論文の項: 文献 5)。

この研究では、総計 14,186 例のサンプル



において、典型 AMD と PCV 間の相違に関連する遺伝子を検索した。その結果、*FGD6* *Lys329Arg* (rs77466370) の典型 AMD と PCV との関連の相違が示された。この *FGD6* の rs77466370 多型は、PCV との関連は証明されたが ($p=2.19 \times 10^{-16}$, OR 2.12) 典型 AMD には関連が見られなかった ($p=2.56 \times 10^{-1}$, OR 1.13)。これは *FGD6* が PCV の病態形成のみに特異的に何らかの関連を持つことを示すものであり、二つのサブタイプの間での差が検証された初めての遺伝子多型である。上図は、その時のマンハッタンプロットで、PCV における GWAS・EWAS の結果を示したものである。既知の *CFH*、*ARMS2-HTRA1* 遺伝子に次いで、*FGD6* の P 値が高かった。また、この *FGD6* の機能解析では、まず *FGD6* の発現特異性をみた。*FGD6* は様々な組織や培養細胞中に発現するが、特に脈絡膜と RPE および網膜毛細血管内皮細胞 (HRECs) に強く発現した。このことから *FGD6* が網脈絡膜の内皮細胞に重要な機能があることが推察された。また、GFP と wild-type の *FGD6* を導入した HRECs をコントロールとし、*FGD6* を導入した HRECs の Tube formation を比較すると、有意に増加していた。このことから、*FGD6* が、血管構築が異常な PCV の形成に何らかの関与していることが示された。

(2) AMD の各サブタイプ間の疾患感受性遺伝子の検索：RAP について

RAP は AMD 全体の 5% 未満と比較的希少疾患であること、当該科学研究費を申請した後に、研究代表者の全く予測をしていなかった疾病罹患とそれに伴う施設移動があったこと、などから、サンプル収集が計画通りに進行させることが出来なかった。それでも目標数 100 サンプルに対し、現時点で 68 例まで収集までとなっている。この採取されたサンプルの約半数に対し、Exome 解析を行った。具体的な統計解析はサンプル数が目標に達したら直ぐに行う予定である。また、サンプル採取も引き続き行っている。

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 8 件)

(1) Cheng CY, Yamashiro K, Chen LJ, Ahn J, Huang L, Huang L, Cheung CM, Miyake M, Cackett PD, Yeo IY, Laude A, Mathur R, Pang J, Sim KS, Koh AH, Chen P, Lee SY, Wong D, Chan CM, Loh BK, Sun Y, Davila S, Nakata I, Nakanishi H, Akagi-Kurashige Y, Gotoh N, Tsujikawa A, Matsuda F, Mori K, Yoneya S, Sakurada Y, Iijima H, Iida T, Honda S, Lai TY, Tam PO, Chen H, Tang S, Ding X, Wen F, Lu F, Zhang X, Shi Y, Zhao P, Zhao B, Sang J, Gong B, Dorajoo R, Yuan JM, Koh WP, van Dam RM, Friedlander Y, Lin Y,

Hibberd ML, Foo JN, Wang N, Wong CH, Tan GS, Park SJ, Bhargava M, Gopal L, Naing T, Liao J, Ong PG, Mitchell P, Zhou P, Xie X, Liang J, Mei J, Jin X, Saw SM, Ozaki M, Mizoguchi T, Kurimoto Y, Woo SJ, Chung H, Yu HG, Shin JY, Park DH, Kim IT, Chang W, Sagong M, Lee SJ, Kim HW, Lee JE, Li Y, Liu J, Teo YY, Heng CK, Lim TH, Yang SK, Song K, Vithana EN, Aung T, Bei JX, Zeng YX, Tai ES, Li XX, Yang Z, Park KH, Pang CP, Yoshimura N, Wong TY, Khor CC. New loci and coding variants confer risk for age-related macular degeneration in East Asians. **Nat Commun.** 2015;6:6063. doi: 10.1038/ncomms7063.

(2) Ikeda K, Horie-Inoue K, Ueno T, Suzuki T, Sato W, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Berezikov E, Mano H, Inoue S. miR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting *GOLT1A*. **Sci Rep.** 2015 Aug 10;5:13170. doi: 10.1038/srep13170.

(3) Mori K, Gehlbach PL, Kishi S. Posterior Vitreous Mobility Delineated by Tracking of Optical Coherence Tomography Images in Eyes with Idiopathic Macular Holes. **Am J Ophthalmol.** 2015;159:1132-1141. doi: 10.1016/j.ajo.2015.02.016.

(4) Mori K, Kanno J, Gehlbach PL. Retinochoroidal morphology described by wide-field montage imaging of spectral domain optical coherence tomography. **Retina.** 2016;36:375-384. doi: 10.1097/IAE.0000000000000703.

(5) Huang L, Zhang H, Cheng CY, Wen F, Tam PO, Zhao P, Chen H, Li Z, Chen L, Tai Z, Yamashiro K, Deng S, Zhu X, Chen W, Cai L, Lu F, Li Y, Cheung CG, Shi Y, Miyake M, Lin Y, Gong B, Liu X, Sim KS, Yang J, Mori K, Zhang X, Cackett PD, Tsujikawa M, Nishida K, Hao F, Ma S, Lin H, Cheng J, Fei P, Lai TY, Tang S, Laude A, Inoue S, Yeo IY, Sakurada Y, Zhou Y, Iijima H, Honda S, Lei C, Zhang L, Zheng H, Jiang D, Zhu X, Wong TY, Khor CC, Pang CP, Yoshimura N, Yang Z. A missense variant in *FGD6* confers increased risk of polypoidal choroidal vasculopathy. **Nat Genet.** 2016;48:640-647. doi: 10.1038/ng.3546.

(6) Momozawa Y, Akiyama M, Kamatani Y, Arakawa S, Yasuda M, Yoshida S, Oshima Y, Mori R, Tanaka K, Mori K, Inoue S, Terasaki H, Yasuma T, Honda S, Miki A, Inoue M, Fujisawa K, Takahashi K, Yasukawa T, Yanagi Y, Kadonosono K, Sonoda KH,

Ishibashi T, Takahashi A, Kubo M. Low-frequency coding variants in CETP and CFB are associated with susceptibility of exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. *Hum Mol Genet.* 2016;25:5027-5034. doi: 10.1093/hmg/ddw335.

(7) Yamashiro K, Mori K, Honda S, Kano M, Yanagi Y, Obana A, Sakurada Y, Sato T, Nagai Y, Hikichi T, Kataoka Y, Hara C, Koyama Y, Koizumi H, Yoshikawa M, Miyake M, Nakata I, Tsuchihashi T, Horie-Inoue K, Matsumiya W, Ogasawara M, Obata R, Yoneyama S, Matsumoto H, Ohnaka M, Kitamei H, Sayanagi K, Ooto S, Tamura H, Oishi A, Kabasawa S, Ueyama K, Miki A, Kondo N, Bessho H, Saito M, Takahashi H, Tan X, Azuma K, Kikushima W, Mukai R, Ohira A, Gomi F, Miyata K, Takahashi K, Kishi S, Iijima H, Sekiryu T, Iida T, Awata T, Inoue S, Yamada R, Matsuda F, Tsujikawa A, Negi A, Yoneya S, Iwata T, Yoshimura N. A prospective multicenter study on genome wide associations to ranibizumab treatment outcome for age-related macular degeneration. *Sci Rep.* 2017;7:9196. doi: 10.1038/s41598-017-09632-0.

(8) Tsukahara M, Mori K, Gehlbach PL, Mori K. *Ophthalmology.* 2018 doi: 10.1016/j.ophtha.2018.02.039. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) 尾花明、森圭介、飯島裕幸、五味文、安川力、大谷篤史. インストラクションコース. 加齢黄斑変性の治療戦略. 第 69 回日本臨床眼科学会. 名古屋国際会議場. 2015.10.24. 名古屋市、愛知.

(2) Mori K, Kishi S. Posterior Vitreous Mobility in Eyes with Epiretinal Membrane, Vitreomacular Traction Syndrome and Macular Hole. Distinguish paper symposium. 第 54 回日本網膜硝子体学会. 2015.12.05. 東京国際フォーラム、東京.

(3) 森圭介. 加齢黄斑変性の鑑別と遺伝子. アイリーア 3 周年記念講演会. 2016.02.12. ホテル東日本宇都宮、栃木.

(4) Horie-Inoue K, Ueyama K, Mori K, Inoue S. Potential androgen receptor-mediated gene regulatory pathways in a mouse model of laser-induced choroidal neovascularization. XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research. September 25-29, 2016, Tokyo, Japan.

(5) 堀江公仁子、上山数弘、森圭介、井上聡. 脈絡膜血管新生モデルにおける遺伝子発現ネットワーク. 脳心血管抗加齢研究会 02016. 2016.12.17-18. 秋葉原 UDX, 東京.

(6) 森圭介、堀江公仁子. 次世代シーケンサーによる加齢黄斑変性類縁疾患感受性遺伝子の同定. 第 6 回国際医療福祉大学学会. 国際医療福祉大学. 2016.08.28. 那須塩原、栃木.

(7) 尾花明、森圭介、飯島裕幸、五味文、安川力、柳靖雄. インストラクションコース. 黄斑疾患の治療戦略! AMD の VEGF 阻害剤治療. 最小の治療で最善を得るには?」第 70 回日本臨床眼科学会. 国立京都国際会館. 2016.11.05. 京都市、京都.

(8) 塚原麻由佳、森圭子、鎌田泰彰、原直人、菅野順二、篠田啓、新井田孝裕、森圭介. 正常眼における後部硝子体剥離の進展様式. 第 121 回日本眼科学会総会. 2011.04.07. 東京国際フォーラム. 東京.

(9) Keisuke Mori, Mayuka Tsukahara, Keiko Mori, Peter L. Gehlbach. Vitreous Mobility in Eyes with Epiretinal Membrane, Vitreomacular Traction Syndrome and Macular Hole. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017. 2017.5.10. Baltimore, MD, USA.

(10) Mayuka Tsukahara, Keiko Mori, Peter L. Gehlbach, Keisuke Mori. Evolution of vitreoretinal separation in normal subjects as described by wide-angle montage imaging of optical coherence tomography. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017. 2017.5.11. Baltimore, MD, USA.

(11) 尾花明、森圭介、飯島裕幸、五味文、安川力、柳靖雄. インストラクションコース. 黄斑疾患の治療戦略. 「黄斑疾患徹底解説 病態および診断から治療戦略まで」第 71 回日本臨床眼科学会. 東京国際フォーラム. 2017.10.12. 東京都.

(12) 堀江公仁子、木村至、樺澤昌、土橋尊志、池田和博、森圭介、井上聡. 次世代シーケンサーを用いた滲出型加齢黄斑変性類縁疾患の疾患感受性遺伝子の解析. 第 15 回 RCGM. 埼玉医科大学創立 30 周年記念講堂. 2017.12.1-2. 埼玉県日高市.

(13) 複視を訴えたレビー小体型認知症患者に対する白内障手術とその効果. 原直人、鎌田康彰、小野里規子、塚原麻由佳、新井田孝裕、森圭介. 第 74 回栃木県眼科集談会. 宇都宮市医師会館. 2017.11.24. 宇都宮、栃木.

(14) 高血圧網膜症における網膜下血腫とインドシアニングリーン蛍光眼底造影所見．塚原麻由佳、小野里規子、江塚彩芽、高津戸佑騎、森圭介．第 74 回栃木県眼科集談会．宇都宮市医師会館．2017.11.24. 宇都宮、栃木．

(15) 正常眼における後部硝子体剥離の初期変化．塚原麻由佳、森圭子、鎌田康彰、高津戸佑騎、原直人、新井田孝裕、森圭介．第 56 回日本網膜硝子体学会総会．東京国際フォーラム．2017.12.1. 東京．

(16) 正常眼と黄斑円孔眼の後部硝子体皮質の形態と可動性の比較．森圭介、塚原麻由佳、菅野順二．第 56 回日本網膜硝子体学会総会．東京国際フォーラム．2017.12.1. 東京．

6．研究組織

(1) 研究代表者

森 圭介 (MORI, Keisuke)
国際医療福祉大学・医学部・教授
研究者番号：90251090

(2) 研究分担者

堀江 公仁子 (HORIE Kuniko)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：90261982