

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15738

研究課題名(和文) 遺伝子多型間相互作用解析による難治性眼表面疾患発症予測システム開発の先駆的研究

研究課題名(英文) Research on development of a prediction system for the onset of severe ocular surface disease by analysis of gene polymorphism interaction

研究代表者

木下 茂 (Kinoshita, Shigeru)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30116024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目的は、難治性眼表面疾患Stevens-Johnson症候群の発症予測システムの開発にある。本研究では難治性眼表面疾患Stevens-Johnson症候群が極めて稀な発症である事から新生変異の可能性に着目して全ゲノムシーケンス解析を用いた新規疾患関連遺伝子の探索を行った。難治性眼表面疾患Stevens-Johnson症候群眼合併症が感冒薬の服用後に発症する事が多いことより、事前のハイリスク予測は発症予防に貢献でき、また、新たな疾患関連遺伝子の発見は、病態解明を促進し新規治療薬の開発に寄与できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to develop a prediction system for onset of severe ocular surface disease, Stevens-Johnson syndrome. In this study, we investigated new disease-related genes using whole-genome sequencing analysis focusing on the possibility of newborn mutation because Stevens-Johnson syndrome, which is severe ocular surface disease, is extremely rare. Stevens - Johnson syndrome with severe ocular complications often occur after taking cold medicines, so preliminary high - risk prediction can contribute to the prevention of the onset of this disease, and the discovery of new disease - related genes which might contribute the pathological condition of this disease, is expected to promote elucidation and contribute to the development of new therapeutic drugs.

研究分野：眼科学

キーワード：遺伝子解析 遺伝子多型 variants 発症予測 全ゲノムシーケンス

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、難治性眼表面疾患である Stevens-Johnson 症候群(SJS)の遺伝素因解析を行い、多数の疾患関連遺伝子を見出している。例えば、HLA 解析では *HLA-A*02:06* が強く関連することを報告している(Sci Rep 2014)。また、候補遺伝子解析では、*TLR3 SNPs* (Br J Ophthalmol 2007)、全ゲノム関連解析では、*PTGER3 SNPs* (J Allergy Clin Immunol 2010)、*IKZF1 SNPs* (J Allergy Clin Immunol 2015)、*TSHZ2 SNPs* 等の重要な疾患関連遺伝子多型を見出している。また、HLA 型と遺伝子多型のある組合せでは、遺伝子多型間相互作用を示しオッズ比が著明に上昇することも明らかとしている。例えば、*HLA-A*02:06* オッズ比 5.1 と *TLR3 rs3775296 TT* オッズ比 5.9 の両方を持っている人はオッズ比が 47.7 倍まで上昇することを明らかとしている(PLoS One 2012)。

しかしながら、全ゲノム関連解析(GWAS)による common SNP の解析だけでは同定できない遺伝素因の存在が明らかとなり、¹⁾ 新たな遺伝子解析の手法として次世代シーケンサーを用いた rare variants の解析が注目されている (missing heritability)。特に近年、一部の疾患においては疾患罹患者のみが有する新生変異の疾患発症リスクへの寄与が明らかになり、発症患者およびその両親 (非発症者) を対象に次世代シーケンサーを用いた新生変異解析の重要性が認識されている。

2. 研究の目的

本研究では、SJS が年間 100 万人に数人の発症と極めて稀な疾患である一方、家系内における疾患発症集積例が少ないことから、新生変異が発症に参与している可能性に着目し、包括的な遺伝素因の解析を行った。

3. 研究の方法

1) 患者とその両親の 3 名を 1 家系とした 4 家系 12 名のサンプルを用いて全ゲノムシーケンズ解析を行った (当初の予定は、3 家系 9 名の解析の予定であったが、サンプルが入手可能となり急遽 4 家系 12 名に増やした)。全ゲノムシーケ

ンス解析には、精度が高いことが知られている Illumina 社 HiSeq™ システムを用いた。

2) 得られた結果を種々の解析ソフトを用いて詳細に解析し疾患罹患者でのみ存在する新生変異が確認できる遺伝子を同定した。理化学研究所所有の日本人全ゲノム配列データ (1000 名) を共同研究を通じて使用し、高精度な全ゲノム塩基配列の決定を行った。出力されるゲノムデータは数十 Tb レベルの高容量となるため、高性能計算サーバーシステムおよび NGS データ解析専用ソフトウェア (BWA, GATK, SHAPEIT) を用いたデータ解析を行った。

3) 新規疾患関連遺伝子 variant (新生変異: De Novo Mutation) については、12 名のサンプルを用いてサンガー法にてタイピングを行い、NGS のデータに間違いがないか検証した。

4. 研究成果

4 家系 12 人分の全ゲノムシーケンズ解析で得られたデータの品質は、均一に調整されていた。

- pair-end
- 約 4.5 億 read
- read length 35-151
- %GC 40, 41%
- adapter 混入
Forward 側: 2 万前後
Reverse 側: 15-65 万

ソフトは、主に、GATK の Best Practice を用い、基本的に準じて行った。

De Novo Mutation について解析した。

De Novo Mutation の filtering には、変異率 $1.0 \sim 1.5 \times 10^{-8}$ 父親 36 歳の場合、72-96 個/児と推定 その結果、下表の数の De Novo Mutation が検出された。

	S121	S192	S193	S200
TOTAL	64	91	86	73
downstream	1	0	0	1
exon	1	2	0	0
intergenic	40	45	46	37
intronic	20	36	33	30
ncRNA_exonic	0	0	0	1
ncRNA_intronic	2	6	6	1
splicing	0	0	0	1
UTR3	0	1	0	2
UTR5	0	0	1	0
upstream	0	1	0	0

2)
a)

b) 続いて、De Novo Mutation の絞り込みを行った。

De Novo Mutationの条件			
・常染色体			
	Father	mother	child
①	0/0	0/0	0/*
②	*/*	*/*	0/*
・性染色体			
子が女性：X染色体は常染色体と同様の解析 Y染色体は対象外			
子が男性：X染色体は母と比較 “子がHom-Alt、母がそのAltを持たない”			
Y染色体は父との比較 “子がHom-Alt、父がそのAltを持たない”			
そのうえでDP>15 かつ GQ>20 のもの			

De Novo Mutationの絞り込み	
・ GQ>20 DP>5 DP>60&GQ<95	4.
・ Rsがついているものを除去	
・ 東北メガバンク	
RefとAltが共通 かつ Altの頻度が0.1%以上のものを除去	
・ 5bp以上のHomopolymerRunを除去	
・ 5dB以内に近接して存在する Indel、snvのsetを除去	5.

その結果、可能性のある De Novo Mutation として下記を選択した。

GWASで報告されたSJSの疾患関連遺伝子の近傍に位置したも

Trio ID	Chr:Position	Gene	前後Geneまでの距離
S200	7:****35	C7orf72 - IKZF1	dist=****;dist=****

exon領域に認めたもの

Trio ID	Chr:Position	Gene
S192	7:****62	**** nonsynonymous SNV
S121	3:*****00	**** nonframeshift deletion
S192	16:****20	**** nonframeshift insertion

3) 見出された De Novo Mutation については、6. 12名のサンプルを用いてサンガー法にてタイピングを行ったところ、NGSのデータに間違いがないことが確認された。

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. Kohanim S , Palioura S , Saeed HN , Akpek EK , Amescua G , Basu S , Blomquist PH , Bouchard CS , Dart JK , Gai X , Gomes JA , Gregory DG , Iyer G , Jacobs DS , Johnson AJ , Kinoshita S , Mantagos IS , Mehta JS , Perez VL , Pflugfelder SC , Sangwan VS , Sippel KC , Sotozono C , Srinivasan B , Tan DT , Tandon R , Tseng SC , Ueta M , Chodosh J. Acute and Chronic Ophthalmic Involvement in Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis - A Comprehensive Review and

- Guide to Therapy. II. Ophthalmic Disease. Ocul Surf. 2016 Apr;14(2):168-88. (査読有)
- Jain R ,Sharma N ,Basu S ,Iyer G ,Ueta M , Sotozono C ,Kannibiran C ,Rathi VM ,Gupta N , Kinoshita S , Gomes JA , Chodosh J , Sangwan VS. Stevens Johnsons Syndrome: The Role of an Ophthalmologist. Surv Ophthalmol. 2016;61(4):369-99. (査読有)
- Saito K, Ueta M, Maekawa K, Sotozono C, Kinoshita S, Saito Y. Plasma Lipid Profiling of Patients with Chronic Ocular Complications Caused by Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis. PLoS One. 2016 Nov 29;11(11):e0167402. (査読有)
- Jain R, Sharma N, Basu S, Iyer G, Ueta M, Sotozono C, Kannibiran C, Rathi VM, Gupta N, Kinoshita S, Gomes JA, Chodosh J, Sangwan VS. Reply: Amniotic membrane transplantation in Stevens-Johnson Syndrome. Surv Ophthalmol. Surv Ophthalmol. 2017 Mar - Apr;62(2):249-250. (査読有)
- Ueta M , Sawai H , Shingaki R, Kawai Y, Sotozono C ,Kojima K, Yoon KC ,Kim MK , Seo KY ,Joo CK ,Nagasaki M, Kinoshita S , Tokunaga K. Genome-wide association study using the ethnicity-specific Japonica array: Identification of new susceptibility loci for cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe ocular complications. *J Human Genetics*. 2017 Apr;62(4):485-489. (査読有)
- Wakamatsu TH, Ueta M, Tokunaga K, Okada Y, Loureiro RR, Costa KA, Sallum JM, Milhomens JA, Inoue C, Sotozono C, Gomes JÁ, Kinoshita S. Human Leukocyte Antigen Class I Genes Associated With Stevens-Johnson Syndrome and Severe Ocular Complications Following Use of Cold Medicine in a Brazilian Population. *JAMA Ophthalmol*. 2017 Apr 1;135(4):355-360. (査読有)
- Kannibiran C, Ueta M, Sangwan V, Rathi V, Basu S, Tokunaga K, Kinoshita S. Association of Human Leukocyte Antigen Class 1 genes with Stevens Johnson Syndrome with severe ocular complications in an Indian population. *Sci Rep*. 2017 Nov 21;7(1):15960. (査読有)
- Ueta M, Hamuro J, Nishigaki H, Nakamura N, Shinomiya K, Mizushima K, Hitomi Y, Tamagawa-Mineoka R, Yokoi N, Naito Y, Tokunaga K, Katoh N, Sotozono C, Kinoshita S. Mucocutaneous Inflammation in the Ikaros Family Zinc Finger 1 (IKZF1) -

keratin 5 specific transgenic mice. Allergy.
2018 Feb;73(2):395-404 (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Shigeru Kinoshita. Combat Inflammation in Chronic Stevens Johnson Syndrome. Symposium: Problem Solving in Ocular Surface Disease. Symposium, SOE2017, Barcelona, Spain, June 11, 2017.
2. Mayumi Ueta, Katsushi Tokunaga, Chikara Inoue, Hiromi Sawai, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita, Trial to make the combined genotyping to detect high-risk individuals for cold medicine related Stevens-Johnson syndrome (CM-SJS) with Severe Ocular Complications (SOC), ポスター Wed2210, 2018.10.18 Orland, USA.
3. Shigeru Kinoshita. Keynote Lecture, hCEC Injection Therapy for Bullous Keratopathy, KERAICON2017 Hyderabad, India, December 16, 2017,
4. Shigeru Kinoshita. Surgical Management in Mooren's Ulcer, KERAICON2017 Hyderabad, India, December 16, 2017, symposium.
5. Shigeru Kinoshita. Meibomitis related Keratoconjunctivitis, KERAICON2017 Hyderabad, India, December 16, 2017, symposium
6. Shigeru Kinoshita. Biologics in Ocular Surface Diseases, KERAICON2017 Hyderabad, India, December 16, 2017, symposium
7. Shigeru Kinoshita. Treatment of Mooren Ulcer, APAO 2018, The Inflamed Ocular Surface, シンポジウム 2、2018. 2. 8, 香港、中国
8. Shigeru Kinoshita. Cultured Human Corneal Endothelial Cell Injection Therapy for Bullous Keratopathy, APAO 2018, Contemporary Tissue Engineering of the Cornea, シンポジウム 4、2018. 2. 11, 香港、中国
9. Chitra Kannabiran, Mayumi Ueta, Virender Sangwan, Varsha Rathi, Sayan Basu, Katsushi Tokunaga, Shigeru Kinoshita, Association of Human Leukocyte Antigen Class 1 genes with Stevens Johnson Syndrome with severe ocular complications in an Indian population, APAO 2018, Rapid Fire Cornea, External Eye Diseases & Eye Bank Update Session 1, 口演 8、2018. 2. 9, 香港、中国
10. Shigeru Kinoshita, Translational Research on Corneal Endothelial Regeneration, Cornea and Ocular Surface Biology and Pathology,

Gordon Research Conference, Translational Research: In Search of New Therapies 講演、2018, 2. 21, Venture, USA

11. Mayumi Ueta, Suzuko Ohsako, Shigeru Kinoshita, Regulation of CD11c positive cells by TLR3 in the cornea, Cornea and Ocular Surface Biology and Pathology, Gordon Research Conference, Innate and Acquired Immunity in Corneal Pathophysiology 口演、2018, 2. 21, Venture, USA
12. Shigeru Kinoshita, The current status of the Clinical Trial of Cultured hCEC-injection therapy, The Sixth Fuchs Symposium, Session 1 Genetic and Basic Research, シンポジウム、2018.3.3. Philadelphia, USA

〔図書〕(計 1 件)

1. 上田真由美、Stevens-Johnson 症候群、眼科診療マイスターII、診断と治療,p90-95, 2017, メジカルビュー社

〔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

<http://shigerukinoshita.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木下 茂 (KINOSHITA Shigeru)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 30116024

(2)研究分担者

上田 真由美 (UETA Mayumi)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号 : 60398386

(3)研究分担者

岡田 随象 (OKADA Yukinori)
大阪大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 70727411