

平成30年 5月28日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20315

研究課題名(和文)近視性脈絡膜新生血管の発症および病巣径に関連する遺伝因子の解明

研究課題名(英文) Identification of genetic determinants associated with myopic choroidal neovascularization

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：80724278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近視性脈絡膜新生血管(mCNV)は中心視野障害・視力低下を伴う、強度近視関連眼合併症の代表である。

本研究ではまず、近視性脈絡膜新生血管の発症に関連する候補遺伝子座を、コピー数多型(Copy Number Variant)をマーカーとした全ゲノム領域網羅的関連解析によって探求したところ、EPHA3遺伝子やHCN1遺伝子を含む7か所の遺伝子領域の関連が示唆された。

また、mCNVの前駆病変である近視性黄斑症について、一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism)をマーカーとした全ゲノム領域網羅的関連解析を行ったところ、CCDC102B遺伝子領域の関連が示された。

研究成果の概要(英文)：Myopic choroidal neovascularization (mCNV) is one of the vision-threatening complications in eyes with high myopia.

We performed copy number variation-based genome-wide association study (GWAS) to identify genetic determinants associated with development of mCNV. The GWAS suggested possible associations of seven genetic loci including EPHA3 and HCN1 genes with mCNV ($P < 0.05$).

We also performed two-stage single nucleotide polymorphism-based GWAS to identify genetic determinants associated with myopic maculopathy, which includes mCNV and myopic chorioretinal atrophy. The GWAS identifies a susceptibility locus at rs11873439 in an intron of CCDC102B ($P = 1.77 \times 10^{-12}$). We further conducted replication analysis on the association between CCDC102B rs11873439 and myopic maculopathy development using high myopia samples. The fixed effect meta-analysis revealed strong association between rs11873439 and myopic maculopathy development ($P = 2.40 \times 10^{-6}$).

研究分野：眼科

キーワード：近視性脈絡膜新生血管 強度近視 脈絡膜 遺伝子多型 全ゲノム関連解析

1. 研究開始当初の背景

強度近視は、緑内障・網膜剥離など様々な眼疾患の危険因子である。近視性脈絡膜新生血管はそのような強度近視関連眼合併症のひとつであり、新生血管からの漏出成分・出血の網膜下貯留やそれらに起因する網膜内浮腫が遷延すると視力低下・中心暗点や変視症をきたし、不可逆性の視覚的後遺症を残す。治療としては抗 VEGF 薬の硝子体注射が第一選択として確立しているが、治療前の近視性脈絡膜新生血管病巣径が大きなものは繰り返しの治療が必要で、視力予後不良因子のひとつであることが知られている。このため、近視性脈絡膜新生血管の発症や病巣径拡大(進行)に影響する因子の解明が切望されている。

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。全ゲノム領域を対象として、一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism、以下 SNP)やコピー数多型(Copy Number Variant、以下 CNV)をマーカーとして用いる関連解析(全ゲノム領域網羅的関連解析)というゲノム学的研究手技は、そのような疾患の発症や予後に関与する遺伝子・分子を明らかにしうる。

事実、強度近視そのものについては、ゲノム学的研究手技によって発症に関連する遺伝因子が明らかになりつつある。しかしながら、強度近視関連眼合併症である網脈絡膜変化や近視性脈絡膜新生血管の発症・病巣拡大に関連する遺伝的因子は明らかになっていない。ゲノム学的研究手技を用いて、近視性脈絡膜新生血管の発症や予後、またその前駆病変である近視性網脈絡膜萎縮(近視性黄斑症)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、近視性脈絡膜新生血管の発症に関連する候補遺伝子座を、全ゲノム領域網羅的関連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、近視性脈絡膜新生血管の前駆病変である近視性網脈絡膜萎縮(近視性黄斑症)について、大規模コホートの眼底写真データを基に病期分類を行った上で、全ゲノム領域網羅的関連解析を行い、近視性黄斑症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

3-1. 近視性脈絡膜新生血管の発症に関する全ゲノム領域網羅的関連解析

(1) 対象患者からの採血と DNA 抽出

京都大学眼科・東京医科歯科大学眼科を受診し文書で同意を得た患者と、ながはま0次予防コホート事業に参加し文書で同意を得た日本人症例から、末梢血採血を行い、DNA抽出キットによりDNAを抽出し保存した。過去に文書による同意を取得し採血・DNA抽出・保管を行っていた症例も、今回の検討対象に用いた。

(2) 症例を対象とした、全ゲノム領域網羅的 CNV 解析

既取得および本研究期間中に新規に全ゲノム領域の genotyping データを取得した症例から、眼軸長 26mm 以上の強度近視症例 611 例と、眼軸長 25mm 以下の非強度近視 2,356 例を選別し、全ゲノム領域における CNV 頻度の比較検討を行った。

強度近視患者の genotyping には、時期によって2種類の異なるイルミナ社の全ゲノム網羅的解析用マイクロアレイ DNA チップを用いており(550K アレイと 660K アレイ)、非強度近視症例は同じイルミナ社 DNA チップ(610K アレイと 2.5M アレイ)による全ゲノム領域の genotyping データをもつ症例を解析に用いた。以上の全ゲノム領域 genotyping データを使用して、隠れマルコフモデル(Penn CNV software)を用いることで、全症例に対して CNV 検出を行った。

その後、アレール特異的シグナル強度を用いて Log R 比、B アレール頻度の標準値からの乖離(BAF drift)、サンプル内での LogR 比の一貫性(wave factor)を算出しクオリティコントロールを行った(LogR 比の標準偏差 >0.3 、BAF drift >0.01 、wave factor out of $[-0.05 \sim 0.05]$ 、の症例を除外)。

クオリティコントロールの結果、強度近視症例では 550K チップデータセットで 298 例(平均 CNV 数=13/sample)、660K データセットで 201 例(平均 CNV 数=363/sample)、ながはまコホート症例から 610K チップデータセットで 784 例(平均 CNV 数=43/sample)、2.5M データセットで 632 例(平均 CNV 数=339/sample)を解析に使用した。ながはまコホート症例のうち 131 例は眼軸長 26mm 以上であったため、強度近視として扱った。

(3) 統計学的解析

まず強度近視患者およびながはまコホー

ト症例全てを使用して、強度近視を症例群、非強度近視を対照群として、症例群と対照群との間で、遺伝子領域における CNV 頻度に差があるかどうかの症例-対照関連解析を行った。

次いで、550K チップデータセットの強度近視症例+ながはまコホート症例、660K チップデータセットの強度近視症例+ながはまコホート症例、の2通りのデータセットを使用して、上記と同様の解析を行った。

今回は強度近視症例群・非強度近視対照群のいずれも、異なる全ゲノム網羅的解析用マイクロアレイ DNA チップを用いて genotyping を行っているが、チップによって CNV のコピー数の検出力が異なる。したがって、使用したチップによって3通りの症例-対照関連解析を行い、いずれの解析でも統計学的に有意である遺伝子を抽出した。

3-2. 近視性黄斑症の頻度調査と、発症に関する全ゲノム領域網羅的関連解析

(1) 対象患者からの採血と DNA 抽出

ながはま0次予防コホート事業に参加し文書で同意を得た日本人症例から、末梢血採血を行い、DNA 抽出キットにより DNA を抽出し保存した。過去に文書による同意を取得し採血・DNA 抽出・保管を行っていた症例も、今回の検討対象に用いた。

(2) 症例の近視性黄斑症病期判定と頻度調査

ながはま0次予防コホート事業に参加し、判定可能な眼底写真を有する症例を全ゲノム領域網羅的関連解析の対象者とし、眼底写真を用いて2名の眼科医によって International Meta-Analysis for Pathologic Myopia (META-PM) 分類に基づく近視性黄斑症の病期判定を行った。左右眼で病期が異なる場合は、より重篤な眼の近視性黄斑症病期を採用した。

(3) 対象者の全ゲノム領域網羅的 SNP 解析

先行研究ですでに全ゲノム領域 genotyping が行われている5,299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 (HumanHap610 Quad・HumanOmni2.5-4・HumanOmni2.5-8・HumanOmni2.5s・CoreExome24・HumanExome のいずれか1つ以上) により遺伝子型が決定されていた。

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、

マイナーアレル頻度が1%未満の SNP、ハーディワインベルグ平衡からの逸脱が著明な SNP、遺伝子型決定成功率 99%未満の SNP、遺伝子型決定成功 SNP 頻度が 95%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。

検討可能な SNP 数を最大化するため、症例 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。結果、4,476例の4,710,779 SNPs について、以下の統計学的検討を行った。

全ゲノム関連解析において近視性黄斑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、上記とは別のながはま0次予防コホート事業に参加者3,421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。

ながはま0次予防コホート事業参加者の全ゲノム領域網羅的関連解析によって近視性黄斑症との有意な関連が示された SNP については、京都大学眼科・東京医科歯科大学眼科の受診症例・Singapore Chinese Eye Study (SCES)参加者・Singapore Malay Eye Study (SiMES)参加者・および Singapore Indian Eye Study (SINDI)参加者のうち眼軸長 26mm 以上の強度近視症例について、眼底写真に基づき近視性黄斑症病期を判定して、該当する SNP の遺伝子型と近視性黄斑症との関連を検討した。

(4) 統計学的解析

Discovery set である4,476例について、近視性黄斑症の病期が2・3・4の症例を近視性黄斑症あり群(症例群)病期0・1の症例を近視性黄斑症なし群(対照群)として、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、ロジスティック回帰分析により年齢・性別・眼軸長を補正して検討した。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 $<1.06 \times 10^{-8}$ と定義した。

その後の再現性確認においては、P 値 <0.05 を有意水準とした。全症例の結果を統合した評価も行った(メタアナリシス)。

4. 研究成果

4-1. 近視性脈絡膜新生血管の発症に関する全ゲノム領域 CNV 関連解析結果

強度近視患者およびながはまコホート症例全てを使用した症例-対照関連解析におい

て、10,000 回の Permutation test を行った結果、536 の遺伝子領域において、症例群と対照群で CNV 保有頻度に有意な差を認めた ($P < 0.05$)。

続いて行った 550K チップデータセットの強度近視症例+ながはまコホート症例、660K チップデータセットの強度近視症例+ながはまコホート症例、の 2 通りのデータセットにおける解析では、前述の 536 の遺伝子のうち、20 の遺伝子領域において症例群と対照群で CNV 保有頻度に有意な差を認めた ($P < 0.05$)。

そのうちの 7 つが網膜に発現しているとされている遺伝子であったため、次にこれらの 7 遺伝子に対して、近視性脈絡膜新生血管を有する強度近視サブグループ 170 例を症例群、正常眼の 1,036 例を対照群として、同様に症例-対照関連解析を行った。いずれの遺伝子領域においても正常眼と比較して、近視性脈絡膜新生血管を有する症例では CNV 保有頻度が有意に高く ($P < 0.05$)、10,000 回の permutation test 後も EPHA3 と HCN1 の 2 つの遺伝子は $P < 0.05$ を示した。

強度近視および近視性脈絡膜新生血管の発症と関連することが示唆された 7 領域のうちの 1 つの遺伝子 EPHA3 は視神経乳頭形成に関与しており、HCN1 は網膜光応答に関与している。またいずれの遺伝子領域においても近視性脈絡膜新生血管症例では高頻度に deletion を認めていた。CNV 異常の中でも deletion は病的意義を示す可能性が高いと考えられる。これらの経過については、121 回日本眼科学会 (2017、東京) にて発表を行った。

今後は今回の結果を踏まえ、他データセットを用いた再現性確認や、近視性脈絡膜新生血管の病巣径との関連有無評価など、さらなる検討を行う予定である。

4-2. 近視性黄斑症の発症に関する全ゲノム領域 SNP

ゲノムワイドレベルな有意水準を満たした SNP として、18 番染色体上に存在する rs11873439 を同定した。この SNP は、CCDC102B (coiled-coil domain containing 102B) と呼ばれる遺伝子内に存在していた (図 1)。

京大及び東京医科歯科大学における強度近視患者の DNA を用いて検討を行ったところ、日本人強度近視患者において CCDC102B は近視性黄斑症の発症に関与していることが示された。また海外施設の強度近視症例においても再現性の検討を行ったところ、中国人において CCDC102B の遺伝子変異と近視性黄斑

症の発症が再現された (表 1)。マレー人、インド人においてはサンプル数が少なく統計学的に有意ではなかったものの、日本人・中国人と同様のオッズ比を示していた (表 1)。

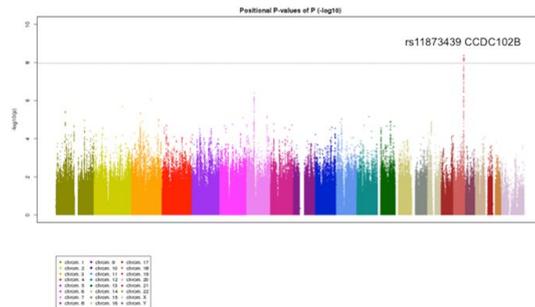


図 1. ながはま 0 次予防コホート事業参加者の近視性黄斑症有無に関する全ゲノム症例対照関連解析のマンハッタンプロット。CCDC102B 遺伝子領域の rs11873439 がゲノムワイド水準で有意な関連を示している。

Ethnicity	Stage	Effect allele	Myopic maculopathy (-)		Myopic maculopathy (+)		p	OR (95% CI)
			N	EAFF	N	EAFF		
Japanese	Within Nagahama	C	515	0.423	313	0.516	2.74×10^{-4}	1.45 (1.19 - 1.78)
	Kyoto, Tokyo	C	190	0.397	968	0.461	0.0221	1.29 (1.03 - 1.60)
	Meta	C	705	-	1281	-	2.70×10^{-5}	1.38 (1.19 - 1.60)
Chinese	SCES	C	134	0.369	41	0.488	0.0458	1.76 (1.01 - 3.07)
Malay	SIMES	C	35	0.386	36	0.444	0.448	1.32 (0.642 - 2.73)
Indian	SINDI	C	62	0.0807	23	0.130	0.338	1.68 (0.580 - 4.88)
Meta	5 collections	C	936	-	1381	-	2.40×10^{-6}	1.40 (1.22 - 1.61)

EAFF, effect allele frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.
*adjusted for age, sex, and axial length

表 1. 各施設の強度近視症例について、近視性黄斑症と、CCDC102B 遺伝子領域の rs11873439 との関連を検討した結果。

これらの結果については、学術論文として専門誌に報告した (Nature communications, 2018)。

今後は今回の結果を踏まえ、近視性黄斑症の発症に CCDC102B 遺伝子がどのように関与するのかの検討を行う予定である。また、近視性黄斑症の中でどのような症例が近視性脈絡膜新生血管を発症するのかに関して、さらなる検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshikatsu Hosoda, Munemitsu Yoshikawa, Masahiro Miyake, Yasuharu Tabara, Noriaki Shimada, Wanting Zhao, Akio Oishi, Hideo Nakanishi, Masayuki Hata, Tadamichi Akagi, Sotaro Ooto, Natsuko Nagaoka, Yuxin Fang, Nagahama Study group, Kyoko Ohno-Matsui, Ching-Yu Cheng, Seang Mei Saw, Ryo Yamada, Fumihiko Matsuda, Akitaka Tsujikawa &

Kenji Yamashiro. CCDC102B confers risk of low vision and blindness in high myopia. Nature Communications. 査読有, 2018, 1782. doi:10.1038/s41467-018-03649-3

〔学会発表〕(計1件)

コピー数多型解析を用いた強度近視のゲノムワイド関連解析

細田祥勝、仲田勇夫、吉川宗光、山城健児、辻川明孝

第121回日本眼科学会総会、2017年、東京

〔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：80724278

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし