

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11459

研究課題名(和文) 多民族の円錐角膜患者を対象としたゲノムワイド関連解析

研究課題名(英文) Genome-wide association study of keratoconus using several ethnic populations

研究代表者

目黒 明 (Meguro, Akira)

横浜市立大学・医学研究科・特任准教授

研究者番号：60508802

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)：円錐角膜は、角膜の菲薄化、変形を主徴とする進行性の非炎症性変性疾患であり、進行すると重度の視力障害をきたす場合がある。円錐角膜の発症要因は明確ではないものの、その発症には遺伝要因と環境要因が複合的に関与していることが示唆されている。本研究では、円錐角膜の疾患感受性遺伝子を同定するため、日本人集団と韓国人集団を対象とした円錐角膜のゲノムワイド関連解析を実行した。その結果、円錐角膜とゲノムワイドレベル($P < 5E-8$)の相関を示す複数の疾患感受性遺伝子領域を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、円錐角膜の発症機序および病態の全容解明の一助となることが期待されます。また、本研究の遺伝情報は、円錐角膜の迅速な遺伝子診断構築の基礎となり、患者への早期の適切な治療を可能にする。円錐角膜の早期発見・早期治療は、円錐角膜患者の予後を改善し、本症による重篤例の低下を促すと考えられる。さらに、遺伝要因を介した円錐角膜の形成機序が解明されれば、遺伝要因を対象とした新規治療薬の開発も可能になり、その医学的意義は大変高いといえる。

研究成果の概要(英文)：Keratoconus is a non-inflammatory corneal disorder characterized by progressive thinning of the corneal tissue, which can lead to severe visual impairment. The exact etiology of keratoconus remains uncertain, but the disease is currently thought to be triggered by various genetic and environmental factors. In this study, we performed a genome-wide association study of keratoconus using Japanese and Korean populations. This study identified several susceptibility loci, which showed genome-wide significant associations ($P < 5E-8$) with keratoconus.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：円錐角膜 遺伝子 ゲノムワイド関連解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 円錐角膜は進行性の角膜実質の菲薄化を特徴とする非炎症性の角膜障害であり、進行すると重篤な視覚障害をきたす疾患である。初期では自覚症状に乏しく裸眼視力も良好で、近視性乱視と診断される症例が多いが、角膜の菲薄化が進行すると角膜不正乱視を生じ、視力低下をきたす。視力障害が進行すると角膜移植以外に治療の方法がなくなるため、円錐角膜の早期の診断および早期の治療が必要とされる。

(2) 円錐角膜の有病率には人種差が認められており、欧米では 10 万人あたり 30~230 人の患者が、ロシアでは 10 万人あたり 0.2~0.4 人の患者が、インドでは 10 万人あたり 2,300 人の患者が報告されている (Kok YO, et al. *Cornea*. 2012;31(5):581-593. Gorskova EN, et al. *Vestn Oftalmol*. 1998;114(4):38-40.)。一方、本邦では 10 万人あたり 17.3 人の円錐角膜の有病率が報告されており、女性に比べて男性の方が円錐角膜の有病率が高い (Tanabe U, et al. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1985;89(3):407-411.)。

(3) 円錐角膜の発症要因は明確ではないものの、円錐角膜は複数の遺伝要因 (疾患感受性遺伝子) と環境要因が複合的に作用して発症する多因子遺伝性疾患であると考えられている。家族間や双子間を対象とした円錐角膜の発症リスクに関する調査において遺伝要因が重要とされるエビデンスが示されており、近親間における円錐角膜の発症リスクは一般集団よりも高いこと (Ihalainen A. *Acta Ophthalmol Suppl*. 1986;178:1-64. Rabinowitz YS. *Surv Ophthalmol*. 1998;42(4):297-319. Wang Y, et al. *Am J Med Genet*. 2000;93(5):403-409.)。一卵性双生児間では高い確率で円錐角膜の発症の一致が観察されること (Parker J, et al. *J Refract Surg*. 1996;12(1):180-183. Bechara SJ, et al. *Cornea*. 1996;15(1):90-93. Tuft SJ, et al. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(6):e482-486.) が報告されている。このように、円錐角膜の発症には何らかの遺伝要因が関与していることが示唆されており、円錐角膜の遺伝要因 (疾患感受性遺伝子) を網羅的に特定することは疾患の適切な診断および早期の治療を可能にすると考えられる。

(4) 近年、円錐角膜を対象としたゲノム全域を網羅する遺伝子多型解析 (ゲノムワイド関連解析: genome-wide association study (GWAS)) が実行されており、円錐角膜の発症に關する疾患感受性遺伝子領域が網羅的にスクリーニングされている。アメリカの白人集団を対象とした GWAS では、円錐角膜の疾患感受性領域として 13 領域が報告されている (Li X, et al. *Hum Mol Genet*. 2012;21(2):421-429.)。また、ヨーロッパ系の白人集団を対象とした GWAS では、円錐角膜の疾患感受性領域として新たに 5 領域をピックアップしている (Lu Y, et al. *Nat Genet*. 2013;45(2):155-163.)。一方、白人以外の人種集団を対象とした円錐角膜の GWAS はこれまでに報告されていない。

(5) したがって、本研究では、日本人と韓国人を含むアジア人集団を対象とした円錐角膜の GWAS を実行し、円錐角膜の発症リスクに有意に關する疾患感受性遺伝子の網羅的な同定を試みた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、アジア人集団を対象とした円錐角膜の GWAS を実行し、円錐角膜の発症リスクと有意な相関を示す疾患感受性遺伝子を網羅的に同定する。

(2) その後、網羅的に同定した疾患感受性遺伝子を対象にパスウェイ解析を実行し、円錐角膜の発症に關するパスウェイ (生物学的過程・経路) を特定する。

(3) さらに、同定した疾患感受性遺伝子の機能解析も実行し、疾患感受性遺伝子が關する円錐角膜の発症メカニズムおよび病態の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、日本人集団 (円錐角膜患者 200 例、健常者 1,100 例) と韓国人集団 (円錐角膜患者 200 例、健常者 250 例) を用いて、円錐角膜を対象とした GWAS を実行した。本研究における GWAS ジェノタイプピングは、Illumina 社の HumanOmniExpress-24 BeadChip マイクロアレイ (約 73 万個の遺伝子多型マーカー (主に SNPs (single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型)) を搭載) を用いて行った。実験法は Illumina 社のプロトコールに準拠し、iScan システム (Illumina 社) を用いて HumanOmniExpress-24 BeadChip マイクロアレイのスキャンを系統的に実行した。

(2) (1) で取得した GWAS データ (ゲノム全域を網羅する SNP データ) を対象に Imputation 解析を実行し、ゲノム全域をより高密度に網羅する SNP の遺伝子型情報の取得を行った。本 Imputation 解析は、Michigan Imputation Server (<https://imputationserver.sph.umich.edu>) を用いて、Minimac3 アルゴリズムにより実行された。Imputation 解析のリファレンスパネルと

して、1000人ゲノムプロジェクト (<http://www.1000genomes.org/>) の東アジア人集団 (CHB (北京在住の漢民族)、JPT (東京在住の日本人)、CHS (中国南方の漢民族)、CDX (シーサンパンナ・タイ族自治州の中国系タイ族)、KHV (ホーチミンのキン族)) のデータセット (Phase 3 version 5) を用いた。

(3) 日本人集団と韓国人集団の各々の Imputation 解析で取得した GWAS データ (Imputed GWAS データ) を結合した Imputed GWAS メタ解析を実行した。本 Imputed GWAS メタ解析では、SVS ソフトウェア (Golden Helix 社) を用いて、患者・健常者間の関連解析を実行し、円錐角膜と有意な相関を示す SNP の網羅的なスクリーニングを行った。メタ解析における統計解析は、Cochran-Mantel-Haenszel 法を用いた。

(4) (3) で網羅的にスクリーニングした SNP を対象に、Replication 集団 (日本人、韓国人、中国系シンガポール人) を用いて追認試験およびメタ解析を実行した。本解析では、TaqMan アッセイを用いて SNP 解析を行った。TaqMan アッセイは Thermo Fisher Scientific 社のプロトコルに準拠した。

(5) (1) ~ (4) で網羅的に取得した Imputed GWAS メタ解析の SNP データを対象にパスウェイ解析を実行し、円錐角膜の発症に關与するパスウェイ (生物学的過程・経路) の特定を行った。本パスウェイ解析は、研究協力者の Ugur Sezerman 教授 (トルコ・Acibadem 大学) のグループが独自に開発した解析手法 (Bakir-Gungor B, et al. Eur J Hum Genet. 2015;23(5):678-687.) および KEGG や Reactome を含む 32 種類の公開データベースの情報を統合した「ConsensusPathDB」オンラインデータベース (Kamburov A, et al. Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):D793-800. <http://cpdb.molgen.mpg.de/>) を使用して実行した。

(6) 同定した円錐角膜の疾患感受性遺伝子を対象に機能解析を実行した。疾患感受性 SNP に起因する遺伝子発現量の変動を TaqMan アッセイを用いたリアルタイム PCR により評価するとともに、疾患感受性 SNP に伴う発現タンパク質の立体構造および分子動力の変化、他のタンパク分子との相互作用の変動を Modeller ソフトウェア (<http://salilab.org/modeller/>) および Meta-PPISP サーバー (<http://pipe.scs.fsu.edu/meta-ppisp/>) を用いて検討した。また、同定した疾患感受性遺伝子のマウス角膜組織における局在を確認するため、*in situ* hybridization を実行した。

(7) 本研究では、すべての血液検体提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報は連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

(8) 本研究に参加するすべての検体提供施設は、各々の施設の倫理委員会より本遺伝子研究への参加を承認されている。

4. 研究成果

(1) 日本人集団と韓国人集団について、約 73 万個の SNPs を対象とした GWAS ジェノタイプピングを実行し、GWAS の Quality control (QC) 基準 (Call rate > 98%、マイナーアレル頻度 > 1%、ハーディーワインバーグ平衡 $P > 0.00001$) をクリアする約 50 万個の SNPs の GWAS データを取得した。

(2) GWAS の QC 基準をクリアした約 50 万個の SNPs を対象に Imputation 解析を行い、日本人集団と韓国人集団の各々において、Imputation 解析の QC 基準 (マイナーアレル頻度 > 1%、 $r^2 > 0.70$) をクリアするゲノム全域を高密度に網羅する約 500 万個の SNPs データ (Imputed GWAS データ) を取得した。

(3) Imputation 解析で網羅的に取得した日本人集団と韓国人集団の Imputed GWAS データを結合した Imputed GWAS メタ解析を実行し、円錐角膜と相関を示す SNP をゲノム全域に渡って網羅的に見出した。

(4) Imputed GWAS メタ解析で網羅的に見出した SNP を対象に、Replication 集団 (日本人、韓国人、中国系シンガポール人) を用いて追認試験およびメタ解析を実行した結果、ゲノムワイドレベルの有意水準 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) で円錐角膜と相関を示す SNP を複数同定した。

(5) Imputed GWAS メタ解析の SNP データを用いてパスウェイ解析を実行した結果、円錐角膜の発症に關与を示唆するパスウェイ (生物学的過程・経路) および遺伝子オントロジーが複数認められた。

(6) 網羅的に同定した SNP が位置する疾患感受性遺伝子を対象に機能解析を実施した結果、複数の疾患感受性遺伝子において、疾患感受性 SNP に起因すると考えられる疾患感受性遺伝子の発現量の変動(上昇または減少)が円錐角膜の発症および病態に有意な影響を与えていることが示唆された。

(7) 本研究で同定された遺伝情報は、円錐角膜の発症メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。さらに、同定された遺伝情報は、円錐角膜の治療薬の開発にも繋がることが期待される。遺伝要因および関連分子等を対象としたモノクローナル抗体、標的分子結合ペプチドや酵素阻害剤などの円錐角膜の発症・進行予防薬が開発されれば、その医学的意義は大変高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究 分 担 者 | 水木 信久 (Mizuki Nobuhisa) (90336579) | 横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701) | |