

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02687

研究課題名（和文）緑内障GWASで同定したアミノ酸置換変異の解析とNGSによる発症リスク予測法樹立

研究課題名（英文）Establishing a Risk Prediction Method for Primary Open Angle Glaucoma Using Next Generation Sequencer and Analysis on Non-synonymous Variant

研究代表者

田代 啓 (TASHIRO, Kei)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：10263097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：緑内障のゲノム検診法を実現と創薬の起点探索のために研究した。第一に、ジェノタイプ取得プラットフォームを検討した。DNAチップ実験で、コールレート99%を閾値とした結果、2.2%の検体が脱落し、NGSでは、カバレッジ数10を閾値としたところ、脱落した検体は0であったので、NGSが優れていることが判明した。第二にリスク判別方法としてアレルカウント法が優れていることが判明した。第三に、緑内障関連SNPの生化学的機能を解明するため、コンピュータ予測プログラムでタンパク質の立体構造を検討しシトクロムP450のCYP39A1遺伝子が同定された。酵素活性を測定して野生型に比べて優位に低い変異が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は点眼薬治療により視野欠損進行を抑制する介入が可能なため、介入を決定するための低侵襲な血液検査による発症リスク予測法開発が切望されている。信頼性の高い緑内障のゲノム検診法を実現するためには、判別率の高いバリエーションを厳選し、検診チップに搭載する精鋭バリエーションの個数や組み合わせを詳細に検討すること、それを利用する判別方法、最適なジェノタイプのプラットフォームが重要である。判別方法としてアレルカウント法が優位であること、プラットフォームとしてNGSが優位であると結果を得たことは前進である。SNPの生化学的酵素活性への影響まで突き止めた研究は稀有であり、学術的価値が高い。

研究成果の概要（英文）：To realize glaucoma onset risk prediction kit, we did experiments as follows. First, we evaluate two candidate genotyping platforms, Next Generation Sequencer (NGS) and DNA array made by Illumina. As for DNA array, when we set 99% call rate as the threshold, 2.2% of samples turned out to be not suitable. As for NGS, when we set coverage 10 as the threshold, none of the samples turned out to be not suitable. The result told us NGS is better genotyping platform. Secondly, for classification, allele count method turned out to be better than conventional machine learning method. To identify biochemical function of our marker SNPs, we predicted functions of each SNPs using Polyphen-2 3D structure prediction software. Several SNPs on CYP39A1 gene induced harmful 3D structures. Product proteins coded by such harmful SNPs showed lower enzyme activity than wild type.

研究分野：ゲノム医科学、緑内障のゲノムのリスク予測、緑内障の病態と病因解明

キーワード：緑内障 発症リスク GWAS NGS DNAアレイ DNAチップ 判別方法 分子標的

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は点眼薬治療により視野欠損進行を抑制する介入が可能なため、介入を決定するための低侵襲な血液検査による発症リスク予測法開発が切望されている。信頼性の高い緑内障のゲノム検診法を実現するためには、判別率の高いバリエーションを厳選し、検診チップに搭載する精鋭バリエーションの個数や組み合わせを詳細に検討することが重要である。我々は、緑内障リスク予測に有用なマーカーSNP同定について、正常眼圧緑内障(NTG)のGWAS競争で世界1位となったことを契機として緑内障国際コンソーシアムに参加して、2015、2016、2017年に3年連続(後の2論文は共同筆頭著者と共同責任著者として全体を指導) Nature Genetics論文として成果発表した研究実績をあげている。また、2021年にJAMA論文で記載することになる緑内障リスク予測に有用なマーカーSNPの同定と、本研究計画で実施するリスクマーカー同定を進める。これら同定済みのリスク予測マーカーを用いるリスク予測方法実用化に最適なジェノタイプ取得プラットフォームが次世代シーケンサー(NGS)なのか、イルミナ社 Asian Screening Array (ASA) アレイなどを用いるDNAチップなのかは不明である。緑内障リスクマーカーSNPsのジェノタイプ結果を初期治療や予防的介入の時期を予測することにどのように活用するのが最適かの判別方法の創出と最適化を行う。

また、既存薬と分子標的が異なる点眼薬の開発も切望されている。統計的信頼性が高い緑内障リスクマーカーSNP自体またはその近傍に創薬の起点となる変異があると予測されるのでその生化学的機能を解明して、その生化学的プロセスに介入する化合物を同定するための生化学的実験系を確立して点眼薬の開発を目指す。

### 2. 研究の目的

第一の目的は、2015、2016、2017年のNature Genetics論文や2021年にJAMA論文で記載することになる緑内障リスク予測に有用なマーカーSNPと本研究計画で実施するリスクマーカーSNPを用いるリスク予測方法実用化に最適なジェノタイプ取得プラットフォームが次世代シーケンサー(NGS)なのか、イルミナ社 Asian Screening Array (ASA) アレイなどを用いるDNAチップなのかを検証する。リスク判別のための判別方法の改良を重ねている我々は、次世代シーケンサー(NGS)実験もASAアレイなどを用いるDNAチップ実験も自分の研究室の機械で実施しているのでそれぞれのジェノタイプング方法の長所と短所と注意すべき問題点を知っているのでこの比較検証が可能である。

第二の目的は、緑内障リスクマーカーSNPsのジェノタイプ結果を初期治療や予防的介入の時期を予測することにどのように活用するのが最適かの判別方法の創出と最適化である。

第三の目的は、統計的信頼性が高い緑内障リスクマーカーSNP自体またはその近傍に創薬の起点となる変異があると予測されるのでその生化学的機能を解明して、その生化学的プロセスに介入する化合物を同定するための生化学的実験系を確立することである。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下のように倫理面に配慮して研究を実行した。研究期間全体にわたり緑内障症例群および対照群由来の臨床情報とゲノム情報を取り扱うので、関連する倫理と法令を遵守しながら研究を実行する。また、国際共同研究においては、各国各施設での倫理委員会の承認とイ

ンフォームドコンセントの下に検体を収集し、ジェノタイプデータの取得とその解析を実施した。

国際緑内障遺伝学コンソーシアム (IGGC) のガイドラインに準拠し、本研究の趣旨に同意した者について緑内障専門医により前眼部、眼圧、隅角、眼底検査等を行い、視野 (静的/動的/FDT)、前房隅角および網膜神経線維層厚の測定 (OCT; 光干渉断層計)、視神経乳頭形状解析 (HRT)、網膜視神経線維層解析 (GDx)、前角膜厚・前眼部形状解析 (Pentacam) データを検討した上で、「緑内障診断および緑内障病型」を厳格に決定した。同じ検査により40歳以上の正常ボランティアを選んだ。採血後、連結可能匿名化バーコードを付与しゲノムDNAを抽出すると共に、血漿と全血を保存した。更に、EBウイルスで細胞株を樹立して保存した。アジア人に特化して質の高いゲノム情報を取得できるイルミナ社ASAチップを用いてイルミナ社HiSeq装置を用いてハイブリダイゼーション実験により、44アレイで1056検体について新たにゲノム情報取得を実行した。ジェノタイプングに際しては、イルミナ社が供給しているクラスタリングプロトタイプでは、約3割のSNPについて本研究のハイブリダイゼーション結果と微妙にずれるため領域の微修正を行って、より正確な結果を得た。高精度シーケンス情報と高精度情報臨床に基づくケース・コントロール相関解析を実施した。アレル頻度比較およびジェノタイプ頻度比較の二乗検定により、ケース群に有意なバリエーションを抽出する。マイナーアレル頻度 (minor allele frequency, MAF) によるフィルターは設定せずに、領域内の緑内障に関連する全バリエーション情報を網羅的に取得した。

緑内障で二番目に主要な落屑症候群 (exfoliation syndrome, XFS) から発症する落屑緑内障 (exfoliation glaucoma, XFG) に関連する解析を実行した。国際共同研究の下、XFS/XFG症例・4,028検体と正常コントロール・5,638検体について次世代シーケンサー (NGS) によりゲノム上の全エキソン (エキソーム) データを取得し、相関解析 (エキソーム解析) を実施した。エキソーム解析により同定した遺伝子上の稀なバリエーションについては、疾患との関連性を明らかにするための生化学的な解析を実行した。

第一の目的のプラットフォームの特性と優劣の比較のために、ジェノタイプ実験の品質として国際的に用いられている、DNAチップのコールレート (call rate) と脱落検体数、次世代シーケンサー (NGS) のカバレッジ数を用いる。

第二の目的の判別方法については、今回の研究期間内に特許庁との明細書改訂のやりとりを終えて成立した、2本の特許に記載したアレルカウント法と、従来の機械学習法を比較検討した。

第三の目的の緑内障リスクマーカー-SNP自体またはその近傍に創薬の起点となる変異があると予測されるのでその生化学的機能を解明して、その生化学的プロセスに介入する化合物を同定するための生化学的実験系を確立することについては、次世代シーケンサー (NGS) によるエキソーム解析で同定された変異について、コンピュータ予測プログラム (Polyphen-2) でタンパク質の立体構造に重篤な影響を与えるかどうか検討した。個々のバリエーションを有する変異型を細胞内で強制発現させ、代謝産物を指標とした酵素活性を測定し、野生型と比較した。

#### 4. 研究成果

第一の目的のプラットフォームの特性と優劣の比較のために、ジェノタイプ実験の品質として国際的に用いられている、DNAチップ実験結果のコールレートと脱落検体数、次世代シーケンサー (NGS) のカバレッジ数を実験で得た。DNAチップ実験において、コールレート99%を閾値としてそれに到達していない検体を「脱落」とした。その結果、1056検体のうち23検体が脱落した。脱

落率は約2.2%であった。次世代シーケンサー(NGS)では、最低限10のカバレッジ数が出た変異をデータとして採用した。脱落した検体は0であった。この結果、プラットフォームとして次世代シーケンサー(NGS)が優れていることが判明した。

第二の目的の判別方法については、今回の研究期間内に特許庁との明細書改訂のやりとりを終えて成立した、2本の特許に記載したアレルカウント法が、従来の機械学習法に比べて3%から6%判別成績が優れていた。

第三の目的の緑内障リスクマーカーSNPの生化学的機能を解明して、その生化学的プロセスに介入する化合物を同定するための生化学的実験系を確立することについては、次世代シーケンサー(NGS)によるエキソーム解析で同定された変異について、コンピュータ予測プログラム(Polyphen-2)でタンパク質の立体構造に重篤な影響を与えるかどうか検討した。XFS/XFG症例に特有なバリエーションが既報のLOXL1遺伝子からだけでなくシトクロムP450に属するCYP39A1遺伝子からも新規に同定された。さらに、CYP39A1遺伝子の有害バリエーションを保有する検体数を比較した結果、XFS/XFG症例における保有者数の割合が52/4028であり、正常コントロールの17/5638に比して有意に高いことが判明した。CYP39A1遺伝子の有害バリエーションが全部で42種類あることが判明した。これらのバリエーションについて、個々のバリエーションを有する変異型CYP39A1を細胞内で強制発現させ、CYP39A1の代謝産物を指標とした酵素活性を測定し、野生型CYP39A1と比較した。その結果、42種類のうち34種類の有害バリエーションを有する変異型CYP39A1の酵素活性が野生型に比べて有意に低下していることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takashima Yasuo, Inaba Tohru, Matsuyama Tasuku, Yoshii Kengo, Tanaka Masami, Matsumoto Kazumichi, Sudo Kazuki, Tokuda Yuichi, Omi Natsue, Nakano Masakazu, Nakaya Takaaki, Fujita Naohisa, Sotozono Chie, Sawa Teiji, Tashiro Kei, Ohta Bon	4. 巻 11
2. 論文標題 Potential marker subset of blood-circulating cytokines on hematopoietic progenitor-to-Th1 pathway in COVID-19	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2024.1319980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawaji Kanayama Yuka, Tsukamoto Taku, Nakano Masakazu, Tokuda Yuichi, Nagata Hiroaki, Mizuhara Kentaro, Katsuragawa Taminishi Yoko, Isa Reiko, Fujino Takahiro, Matsumura Kimoto Yayoi, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Taniwaki Masafumi, Tashiro Kei, Kuroda Junya	4. 巻 115
2. 論文標題 miR 17 92 cluster BTG2 axis regulates B cell receptor signaling in mantle cell lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 452 ~ 464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.16027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Tatsuya, Tokuda Yuichi, Nakano Masakazu, Komori Yuya, Hanada Naoya, Tourtas Theofilos, Schl?tzer-Schrehardt Ursula, Kruse Friedrich, Tashiro Kei, Koizumi Noriko, Okumura Naoki	4. 巻 13
2. 論文標題 RNA-Seq-based transcriptome analysis of corneal endothelial cells derived from patients with Fuchs endothelial corneal dystrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-35468-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Yoko, Mori Kazuhiko, Maruyama Yuko, Ueno Morio, Yoshii Kengo, Yamamoto Yuji, Imai Kojiro, Omi Natsue, Sato Ryuichi, Sato Fumiko, Nakano Masakazu, Hamuro Junji, Tashiro Kei, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 32
2. 論文標題 Novel Vertical Cup-to-Disc Classification to Identify Normal Eyes That Maintain Non-Glaucoma Status: A 10-Year Longitudinal Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Glaucoma	6. 最初と最後の頁 127 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IJG.0000000000002109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamio Naoka, Yokota Asumi, Tokuda Yuichi, Ogasawara Chie, Nakano Masakazu, Nagao Miki, Tashiro Kei, Maekawa Taira, Onai Nobuyuki, Hirai Hideyo	4. 巻 209
2. 論文標題 A Novel CD135+ Subset of Mouse Monocytes with a Distinct Differentiation Pathway and Antigen-Presenting Properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 498 ~ 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Taku, Tokuda Yuichi, Nakano Masakazu, Tashiro Kei, Kuroda Junya	4. 巻 6
2. 論文標題 Expression of activated B-cell gene signature is predictive of the outcome of follicular lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1932 ~ 1936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2021005876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 IKEDA YOKO, MORI KAZUHIKO, UENO MORIO, YOSHII KENGO, NAKANO MASAKAZU, SATO RYUICHI, SATO FUMIKO, MARUYAMA YUKO, IMAI KOJIRO, OMI NATSUE, YAMAMOTO YUJI, YAMASAKI TOSHIHIDE, TASHIRO KEI, SOTOZONO CHIE, KINOSHITA SHIGERU	4. 巻 234
2. 論文標題 Seasonal Variation and Trend of Intraocular Pressure Decrease Over a 20-Year Period in Normal-Tension Glaucoma Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 235 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2021.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bell Katharina, Nakano Masakazu, Ueno Morio, Kinoshita Shigeru, Tashiro Kei, Sotozono Chie, Khor Chiea Chuen, Aung Tin, et al.	4. 巻 129
2. 論文標題 Association of the CYP39A1 G204E Genetic Variant with Increased Risk of Glaucoma and Blindness in Patients with Exfoliation Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 406 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.opthta.2021.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Oku Hiroaki, Watanabe Akihideo, Tokuda Yuichi, Nakayama Tomomichi, Tashiro Kei, Sotozono Chie, Nakano Masakazu	4. 巻 172
2. 論文標題 Efficient DNA/RNA extraction from tarsal plates by SK mill, a freeze-crush apparatus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 385 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama Yuki, Nakamura Seikou, Tokuda Yuichi, Nakano Masakazu, Hattori Yasunao, Nishiguchi Hiroki, Toda Yuki, Hosogi Shigekuni, Yamashita Masayuki, Tashiro Kei, Ashihara Eishi	4. 巻 638
2. 論文標題 7,8-Dihydroxy-3-(4 -hydroxyphenyl)coumarin inhibits invasion and migration of osteosarcoma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 200 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslrt.20033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Yosuke, Tsukamoto Taku, Chinen Yoshiaki, Shimura Yuji, Sasaki Nana, Nagoshi Hisao, Sato Ryuichi, Adachi Hiroko, Nakano Masakazu, Horiike Shigeo, Kuroda Junya, Taki Tomohiko, Tashiro Kei, Taniwaki Masafumi	4. 巻 61
2. 論文標題 Detection of novel and recurrent conjoined genes in non-Hodgkin B-cell lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 71 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslrt.20033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ikeda Y, Mori K, Yoshii K, Ueno M, Maruyama Y, Nakano M, Sato R, Omi N, Imai K, Yamamoto Y, Mieno H, Tokuda Y, Tashiro K, Sotozono C, Kinoshita S.
2. 発表標題 Age-related changes in optic disc morphology over a 10-year period in normal subjects.
3. 学会等名 American Academy of Ophthalmology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Yoshii K, Nakano M, Maruyama Y, Imai K, Omi N, Mieno Y, Sato R, Tashiro K, Kinoshita S, Sotozono C.
2. 発表標題 Seasonal variation of intraocular pressure in non-glaucomatous subjects.
3. 学会等名 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Yoshii K, Nakano M, Sato R, Sato F, Maruyama Y, Omi N, Imai K, Yamamoto Y, Yamasaki T, Tashiro K, Sotozono C, Kinoshita S.
2. 発表標題 Trend of continuous intraocular pressure decrease over a 20-year period in Japanese normal tension glaucoma patients.
3. 学会等名 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuda R, Yoshida T, Mizuta I, Watanabe M, Tokuda Y, Sato R, Nakano M, Nakagawa M, Tashiro K, Mizuno T
2. 発表標題 Adult-onset leukoencephalopathy with homozygous LAMB1 missense mutation.
3. 学会等名 17th Asian Oceanian Congress of Neurology
4. 発表年 2021年



〔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	池田 陽子 (Ikeda Yoko) (00433243)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師  (24303)	
研究分担者	木下 茂 (Kinoshita Shigeru) (30116024)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  (24303)	
研究分担者	外園 千恵 (Sotozono Chie) (30216585)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  (24303)	
研究分担者	森 和彦 (Mori Kazuhiko) (40252001)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授  (24303)	
研究分担者	上野 盛夫 (Ueno Morio) (40426531)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  (24303)	
研究分担者	中野 正和 (Nakano Masakazu) (70381944)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  (24303)	
研究分担者	吉井 健悟 (Yoshii Kengo) (90388471)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師  (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
シンガポール	Genome Institute of Singapore	Singapore Eye Research Institute	Singapore National Eye Center	他2機関