

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591928

研究課題名（和文）緑内障の感受性遺伝子同定と罹患性診断、薬剤応答予測への応用

研究課題名（英文）Identification for glaucoma related genes and application for diagnosis and pharmacogenomics

研究代表者

布施 昇男 (FUSE NOBUO)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：10302134

研究成果の概要（和文）：緑内障感受性遺伝子同定のために、一塩基多型を用いたスクリーニングを行った。開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障、嚢性緑内障の症例を用いて相関解析を用い、感受性遺伝子を同定した。また、候補遺伝子解析によって、グルタミントランスポーターである GLAST に低頻度アミノ酸変異を伴う症例を同定した。以上のように一塩基多型、候補遺伝子解析の両面から緑内障感受性遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：We have done the screening for the glaucoma genes using the single nucleotide polymorphisms (SNPs). Using association study, we identified the glaucoma susceptibility genes for primary open angle glaucoma, normal tension glaucoma, and exfoliation glaucoma. We also detect the rare amino acid substitutions in glutamate transporter gene GLAST by candidate gene approach. By the association study using SNPs and candidate gene approach, we detected glaucoma susceptibility genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：遺伝学、遺伝子、ゲノム、臨床

1. 研究開始当初の背景

現在我が国における緑内障有病率（40歳以上）は約5%とされ、人口から概算して緑内障の潜在患者数は約400万人にもなる。2000-2002年の大規模な疫学調査である岐阜県の高治見スタディからは、40歳以上の20人に1人が罹患しているという結果が報告された（日本緑内障学会2004年）。その有病率は、40歳代では2%であるが70歳代になると10%を越え年齢とともに上昇する。病型別

に見てみると閉塞隅角緑内障に比べ原発開放隅角緑内障（Primary open angle glaucoma; POAG）の比率が高く、なおかつ本邦においては正常眼圧緑内障（Normal tension glaucoma; NTG）が、POAGに対し3倍以上の頻度で存在する。また人種間で明らかにNTGの罹患率に有意な差があり、本邦ではNTGが多いこと（約92%）が示されている。また、以前より緑内障には家族歴が関係するとされており、外来にても家族歴を有する症例に

遭遇する頻度は10-20%であり、緑内障原因遺伝子、緑内障感受性遺伝子が存在することが示唆される。原発開放隅角緑内障の原因遺伝子は、1993年の若年性開放隅角緑内障家系の常染色体1番へのマッピングと、1997年のMYOC遺伝子の発見に端を発している。現在まで、GLC1AからGLC1Pまで16の遺伝子座がマッピングされ、遺伝子としてMYOC(GLC1A)、OPTN(GLC1E)、WDR36(GLC1G)などが同定されている。またゲノムプロジェクトの成果により、多因子疾患である糖尿病、高血圧、虚血性心疾患などのありふれた病気(Common Disease)の原因遺伝子が可能となった。単一遺伝子病との違いは、Common Diseaseは複数の比較的弱い遺伝子要素が関係し、それが環境因子と絡み合い発症の原因となるところである。大多数の緑内障は、単一因子のみによって支配されるものではなく、遺伝的要因の他、生活習慣や環境的要素が相互かつ複雑に絡み合いながら、その易罹患性を決定している。また、緑内障の進行度もSNPと関連していると考えられる。近年、HapMap計画に基づく一塩基多型(SNP; Single nucleotide polymorphism)のデータベースは急速に充実し、テーラーメイド医療に向けてのインフラストラクチャーが整ってきている。しかし、これまでのSNPでの緑内障遺伝疫学研究は集団での易罹患性を示しており、個人がどの程度緑内障に罹りやすいかには殆どアプローチされていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題においては、テーラーメイド医療を目指し、①日本人における緑内障の原因遺伝子・感受性遺伝子の同定、②薬剤応答性遺伝子の多型の解析、③遺伝要因、環境要因の関与を統合した量的形質モデルを構築し、諸因子の関与の解明と緑内障罹患性診断への応用を目的とする。そして個人型易罹患性診断への応用を目指し、テーラーメイド医療の実現を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、東北大学病院眼科緑内障外来において収集した開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障、落屑緑内障、発達緑内障検体を用いた。

1) 開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障：常染色体2番の緑内障遺伝子座GLC1B領域上のSNP669個を用い、(狭義)開放隅角緑内障123例、開放隅角緑内障(正常眼圧緑内障)121例、正常対照120例で第一段階のスクリーニング、関連解析を行った。統計学的に有意な6個のSNPに関して、開放隅角緑内障187例、正常眼圧緑内障286例、正常対照271例で第二段階のスクリーニングを行った。また、統計学的に有意なSNPと関

して、表現型との関連解析を行った(シーケンサー、ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer)。

2) また、候補遺伝子である後述するToll-like receptor 4(TLR4)遺伝子に関して、開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障、嚢性緑内障において、8個の一塩基多型(SNP)について解析を行った。TLR4は外因性・内因性のリガンドに対して免疫応答を担う膜貫通型受容体で、熱ショック蛋白と相互作用をもつとされる。

3) 嚢性緑内障は、失明になりやすい緑内障であり手術介入をしても予後は不良である。嚢性緑内障において、候補遺伝子であるCNTNAP遺伝子上の8個のSNPを選択、プライマーを設定し、PCRダイレクトシーケンス法にて、嚢性緑内障109例、正常対照108例においてSNPタイピングを行った。アリル頻度、遺伝子型頻度について、関連解析を行った。

4) 動物モデルはヒトの病態の解析にたいへん有用な場合があり、今回モデルマウスに着目した。グルタミントランスポーターであるGLAST欠損マウスは、眼圧が正常でありながら視神経乳頭陥凹を示し、GLAST遺伝子は正常眼圧緑内障の候補遺伝子である。GLAST遺伝子の候補遺伝子解析を開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障サンプルを用いて行った。

尚、標本は、遺伝子型と表現型(臨床型)を後に解析できるように、臨床データがきちんと整備された貴重な標本である。

(倫理面への配慮)

なおこの研究課題の計画にあたり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、倫理委員会に緑内障遺伝子の解明のために東北大学眼科外来にてDNA検体を採取することについて申請しその承認を得てある。対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を十分考慮し、説明と同意(インフォームド・コンセント)を得た。

4. 研究成果

日本人における緑内障感受性遺伝子同定のために、一塩基多型を用いたスクリーニングを行った。

1) 常染色体2番のGLC1B領域近傍(72~116Mb)のスクリーニングを行った。開放隅角緑内障に関しては、膜貫通型TMEM182遺伝子が病型と相関していることを明らかにした。正常眼圧緑内障に関しては、ミトコンドリアでの糖代謝に関係するHK2遺伝子が正常眼圧緑内障に関連していることを初めて明らかにした。またNCK遺伝子上のSNPも正常眼圧緑内障に関連していることを明らかにした(PLoS ONE, 2013)。

2) 緑内障の開放隅角緑内障, NTG, 嚢性緑内障(XFG)病型毎の表現型とToll like receptor 4(*TLR4*)遺伝子の相関を解明した。*TLR4*遺伝子上の8つのSNPをスクリーニングし、*TLR4*遺伝子上のSNPに有意差を認めた。また、rs1927914、rs1927911、rs12377632、rs2149356のアリル頻度 ($p=0.019, 0.021, 0.038, 0.015, \chi^2$ テスト)。正常眼圧緑内障よりも、むしろ開放隅角緑内障と強く関連していることを示した (Am J Ophthalmol, 2012)。

3) 嚢性緑内障において、神経ペプチド*CNTNAP2*遺伝子上のrs1404699、rs7803992に有意差を認め (アリル頻度 $p=0.0086, 0.00054$)、神経のカリウムチャネルの安定性に関わる*CNTNAP2*遺伝子が、落屑緑内障に関連していることを明らかとした (Mol Vis, 2012)。

4) 今回、GLAST遺伝子のアミノ酸コーディング領域のダイレクタシーケンスの結果、緑内障患者群において440例中20例、非緑内障コントロール群において450例中2例のヘテロ接合の一塩基置換が見出された。全変異についての緑内障患者群とコントロール群の間でフィッシャーの正確確率検定は $p<0.01$ を示し、オッズ比は10.6にも上ることから、変異が患者群に特異的に多いことが示唆された。また、変異によってグルタミン酸取り込み能が低下していることを示した (Journal of Clinical Investigation投稿中)。しかし必ずしもマウスとヒトの病態が分子遺伝学的に一致しないことも明らかにした (BBRC, 2013)。

以上のように相関解析、候補遺伝子解析の両面から緑内障感受性遺伝子を同定した。

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4件)

1. Shi D, Takano Y, Nakazawa T, Mengkegale M, Yokokura S, Nishida K, Fuse N. Molecular Genetic Analysis of Primary Open-angle Glaucoma, Normal Tension Glaucoma, and Developmental Glaucoma for the VAV2 and VAV3 Gene Variants in Japanese Subjects. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有 15;432(3):509-512, 2013. DOI 10.1016/j.bbrc.2013.02.003.
2. Shi D, Funayama T, Mashima Y, Takano Y, Shimizu A, Yamamoto K, Mengkegale M, Miyazawa A, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Nishida K, Nakazawa T, Richards JE, Fuse N. Association of *HK2*

and *NCK2* with Normal Tension Glaucoma in the Japanese Population. PLoS ONE. 査読有 8; e54115, 1-11, 2013.

3. Shimizu A, Takano Y, Shi D, Yokokura S, Yokoyama Y, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nakazawa T, Fuse N. Evaluation of *CNTNAP2* gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese. Mol Vis. 査読有 18; 1395-1401, 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0054115.
4. Takano Y, Shi D, Shimizu A, Funayama T, Mashima Y, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nishida K, Nakazawa T, Fuse N. Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in Japanese subjects with primary open angle, normal tension, and exfoliation glaucoma. Am J Ophthalmol. 査読有 154; 825-832, 2012. DOI 10.1016/j.ajo.2012.03.050.

[学会発表] (計6件)

1. Fuse N. Molecular Genetic Analysis for Glaucoma using Next-Generation Sequencing Technology. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. Subspecialty Symposium. Hyderabad. India, 2013. 1.18
2. Shimizu A, Fuse N, Takano Y, Shi D, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nakazawa T. Evaluation for *CNTNAP2* gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese. The 84th annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL, 2012. 5.10
3. Fuse N. Hot topics. Genetics and Biomarkers in Glaucoma. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. Busan. Korea, 2012. 4.13
4. 布施昇男 遺伝と診断 第23回緑内障学会シンポジウム 小児緑内障、金沢、2012. 9.28
5. 清水愛、布施昇男、高野良真、石棟、鄭曉東、白石敦、大橋裕一、中澤徹 日本人における落屑症候群と*CNTNAP2*遺伝子多型の関連について 第116回日本眼科学会総会 2012. 4.6
6. 高野良真、布施昇男、清水愛、石棟、中澤徹 開放隅角緑内障、嚢性緑内障における

CAV1、CAV2 遺伝子の評価 日本眼科学会
2012. 4. 6

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布施 昇男 (FUSE NOBUO)
東北大学・東北メディカル・メガバンク機
構・教授
研究者番号：10302134

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：