

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592582

研究課題名(和文) 1000Kチップでの落屑緑内障ゲノムワイド関連解析による日本人固有SNPの同定

研究課題名(英文) Identification of Japanese-specific SNP in exfoliation glaucoma patients with genome-wide association analysis of 1000K microarray

研究代表者

池田 陽子 (IKEDA, YOKO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：00433243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は落屑症候群を含む落屑緑内障201例と落屑症候群を含まない非緑内障の正常対照697例を用いてアフィメトリクス社の1000Kマイクロアレイで全ゲノム解析を行った。その結果LOXL1上およびその近傍遺伝子上にボンフェローニ補正を超える有意な34 SNPを同定した。さらに落屑症候群を含む落屑緑内障121例と正常対照263例を用いて再現性取得実験を行った。二つの結果を合わせてメタ解析したところ、最終的に34 SNPがボンフェローニ補正を超える有意差を持って同定された。これらの結果は、正確な落屑緑内障リスク評価に役立つだけでなく、落屑緑内障の病因の分子メカニズムの解明に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We performed a genome-wide association study (GWAS) using 898 samples obtained from Japanese subjects [201 exfoliation syndrome (XFS)/exfoliation glaucoma (XFG) patients and 697 control subjects] by means of 1000K Affymetrix (Santa Clara, CA) microarray. As a result, we identified 34 genome-wide significant single-nucleotide polymorphisms (SNPs) distributed in not only LOXL1 but also in two other genes in the locus. These results were confirmed by analyzing an independent Japanese population consisted of 121 exfoliation syndrome/glaucoma patients and 263 controls. We performed a meta analysis by combining the results of the GWAS and its replication analysis, and we finally obtained 34 SNPs that passed the Bonferroni correction. These results suggested that the combination of newly discovered SNPs might be useful for precise XFG risk assessment, as well as for elucidating the molecular mechanism of XFG pathogenesis through XFS.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：落屑緑内障 全ゲノム解析 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

落屑緑内障は、緑内障診療の上で原発開放隅角緑内障よりも治療に苦慮する疾患である。落屑緑内障に特徴的な落屑物質は若い頃には発現せず、ある程度高齢になってから前房内に現れるため、早期の診断は難しく、原発開放隅角緑内障と診断されてのちに落屑緑内障と判明する症例も多い。また落屑緑内障は眼圧変動が大きく、視野が急激に悪化することもある。またチン氏帯が脆弱で、水晶体が前方移動を起こし、時に急性閉塞隅角緑内障様の臨床症状を呈することもあり、原発開放隅角緑内障よりも臨床像はバリエーションがある。また散瞳不良のため白内障手術も難易度が上がり、線維柱帯切開術に抵抗を示すことも多く、術後成績も不良になりやすい。このような落屑緑内障の原因遺伝子として 2007 年に北欧から Lysyl oxidase like protein 1(LOXL1)遺伝子がゲノムワイド関連解析の手法を用いて報告された。2008 年に我々も含めて日本人サンプルを用いた解析で、LOXL1 が日本人においても疾患関連遺伝子であった上に、rs1048661 のリスクアレルが欧米人で G、日本人では逆の T であるという人種差を認める興味深い知見が得られた。さらに落屑物質が集積する水晶体前囊における LOXL1 mRNA の定量的 PCR を実施した結果、対照群との発現量に有意差は認められなかった。従って、落屑緑内障に関連する日本人固有の遺伝子として LOXL1 以外の遺伝子が存在する可能性が強く示唆されると共に、リスクアレルの方向が逆転していることの学問的説明が強く待たれる状況である。

2. 研究の目的

今回の目的は、落屑緑内障のゲノムワイド関連解析として世界最大の症例数で世界標準最新チップであるアフィメトリクス社 1000K チップを用い、厳密に診断された疾患群と対照群の間でゲノムワイド関連解析を行い、日本人固有 SNP の同定と LOXL1 の関与する方向の詳細を取得する。またリスクアレルの方向が欧米と日本で逆転し、病因となる別の SNP が存在することが強く期待されるので、LOXL1 の次に P 値が高い新たな落屑緑内障関連 SNP を同定する。現在落屑緑内障の連結可能匿名化によるサンプルを多数例収集し、引き続いて 1000K 遺伝子チップを用いてハイブリダイゼーション実験を完了する。次年度には各 SNP のアレル、ジェノタイプ頻度を得て、Hardy 法則への適合をみる。落屑緑内障に関与するマーカー SNP を同定し、同一連鎖不平衡ブロック上に存在すると考えられる真の SNP を割り出していく。

3. 研究の方法

1. サンプルの収集

落屑緑内障症例のゲノムサンプルを 300 例以

上収集した。落屑緑内障の診断は熟練した緑内障専門医があたり、書面による同意を得て末梢血を採取する。一方正常コントロール症例についてはすでに 700 名以上のゲノムを手済みである。コントロールはボランティアを募り、視野 (FDT、ハンフリー静的視野)、眼底写真、HRT、GDx、ペンタカム、ピサンテ、3DOCT による網膜神経線維層厚解析等を施行し、緑内障専門医が診察を行い、複数の緑内障専門医が判定を行った上、緑内障がないと判定された症例から問診上の緑内障家族歴のあるものを除いた症例を厳正に選別している。少なくとも診断時点では落屑緑内障についての厳密な対照群となることを確認する。

2. 1000K チップによる SNP ジェノタイピング情報の取得

落屑緑内障症例から採取され、匿名化管理人によって匿名化のためのバーコードを貼付された血液から BioRobot EZ1 (Qiagen 社) を用いてゲノム DNA を抽出する。抽出したすべてのゲノム DNA について NanoDrop (Thermo Scientific 社) を用いて収量を測定し、その結果をもとに 260 nm/280 nm の比を算出することで品質をチェックする。品質をクリアしたゲノム DNA は、プレートやウェルの位置に起因して反応効率に偏りが生じてしまういわゆる “plate effect” を回避するためにランダム化された後に、アフィメトリクス社の Genome-Wide Human SNP Array 6.0 システムに供する。チップ実験のためのサンプル調製は、すべてアフィメトリクス社から提供されたマニュアルに従い実施する。蛍光標識された断片化 DNA 試料をチップにハイブリダイゼーションした後に、染色・洗浄する。その後、チップをスキャンすることで画像ファイルを取得する。最終的に、専用ソフトウェアを用いて画像ファイルをジェノタイピングデータに変換することで、全ゲノムにわたる 900,000 以上の SNP のジェノタイピング情報を取得する。

3. ケース・コントロール関連解析

取得したジェノタイピング生データを専用サーバに注入後、各 SNP のジェノタイプの頻度計算を実施する。その後、call rate やマイナーアレル頻度 (minor allele frequency, MAF) の厳格なフィルターを設定し、高品質なデータを抽出する。抽出されたデータについて、ジェノタイプおよびアレル頻度に基づく二乗検定を行い P 値を算出し、ケース群で有意な SNP を同定する。同定された上位の SNP については、Hardy 法則への適合を検証すると共に、すべてのジェノタイピングのクラスター画像をチェックし、クラスター不良のデータは排除する。すべてのフィルターをクリアした SNP については、その SNP 周辺の染色体情報 (遺伝子の有無や連鎖不平衡ブロック) を UCSC のゲノムブラウザ (<http://genome.ucsc.edu/>) を用いて解析する。

4. 欧米人データとの比較および統合解析
LOXL1 を同定した欧米グループが取得したイルミナ社のチップを用いた約 300,000SNP についてのジェノタイピングデータと比較し、我々と同一の検定方法により再検定した結果を side-by-side で多角的に比較する。加えて、我々の取得したデータとの統合解析を試みることで、統計学的な検出力を上げ、日本人と欧米人とで共通する LOXL1 以外の SNP の同定も試みる。両者のジェノタイピングシステムが異なるため、両チップに共通する SNP に加えて同一連鎖不平衡ブロックに存在する SNP を抽出するプログラムを構築する。選択された SNP について統合解析を行い、上位 SNP および近傍 SNP について解析を加える。

4. 研究成果

落屑症候群を含む落屑緑内障 201 例と落屑症候群を含まない非緑内障の正常対照 697 例を用いてアフィメトリクス社の 1000K マイクロアレイで全ゲノム解析を行った。その結果 LOXL1 上およびその近傍遺伝子上にボンフェローニ補正を超える有意な 34 SNP を同定した。さらに落屑症候群を含む落屑緑内障 121 例と正常対照 263 例を用いて再現性取得実験を行った。二つの結果を合わせてメタ解析したところ、最終的に 34 SNP がボンフェローニ補正を超える有意差を持って同定された。その結果を Novel common variants and susceptible haplotype for exfoliation glaucoma specific to Asian population. というタイトルで Scientific Report 誌に投稿し、アクセプトされ現在 in press. となっている。

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 5 件)

1. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Ueno M, Imai K, Sato R, Omi N, Adachi H, Kageyama M, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K. Novel common variants and susceptible haplotype for exfoliation glaucoma specific to Asian population. Sci Rep. 査読有 2014 Jun 18;4:5340. doi: 10.1038/srep05340.
2. Maruyama Y, Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Kinoshita S. Morphological analysis of age-related iridocorneal angle changes in normal and glaucomatous cases using anterior segment optical coherence

tomography. Clinical Ophthalmology. 査読有. 2014;8 1-6

3. Maruyama Y, Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Kinoshita S. Effects of Long-Term Topical Prostaglandin Therapy on Central Corneal Thickness. J Ocul Pharmacol Ther. 査読有. 2014 Apr 16. [Epub ahead of print]
4. 多田 香織、上野 盛夫、森 和彦、池田 陽子、今井 浩二郎、木下 茂. 白内障術後に生じた遅発型水晶体起因性続発緑内障の 4 例. あたらしい眼科. 査読有. 30(4)569-572, 2013
5. 加藤 弘明、森 和彦、池田 陽子、生島 徹、小林 ルミ、今井 浩二郎、木下 茂. 円蓋部基底線維柱帯切除術後における留置糸に関連した微小膿瘍様病変の検討. あたらしい眼科. 査読有. 30(3), 401-404, 2013

[学会発表](計 7 件)

1. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Nakano M, Tokuda Y, Omi N, Sato R, Yoshii K, Tashiro K, Kinoshita S. Analysis of Ophthalmic Clinical Data Association for CDKN2B-AS1 Genotype in Normal Subjects. ARVO. 2013.5.6 Seattle
2. Li Z, Khor CC, Ikeda Y, Jia L, Chen LJ, Nakano M, George R, Do T, Abu-Amero K, Tajudin LS, Kee C, Mineo O, Takanori M, Zhang M, Jonas JB, Chau T N, Fuse N, Wong TY, Liu JJ, Garway-Heath DF, Simmons CP, Vijaya L, Kinoshita S, Pang CP, Wang NL, Allingham RR, Hauser MA, Tashiro K, Aung T, Vithana EN. Exome-wide association study for the identification of genes for primary open angle glaucoma (POAG) 63rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2013, 10.22-26, Boston

3. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Yoshikawa H, Maruyama Y, Yoshii K, Kinoshita S. Evaluation of the Age-Related Speed of Anterior Chamber Reduction by 3D Scheimpflug Camera in Japanese Normal Subjects. AAO, 2013, November 16-20 AAO New Orleans
4. 池田 陽子, 森 和彦, 上野 盛夫, 中野 正和, 吉井 健悟, 徳田 雄市, 大見 奈津江, 佐藤 隆一, 田代 啓, 木下 茂. 正常者における CDKN2B-AS1 のジェノタイプ別臨床データの解析. 日本眼科学会. 2013. 4. 5、東京
5. 池田 陽子, 森 和彦, 上野 盛夫, 吉川 晴菜, 加藤 浩晃, 丸山 悠子, 吉井 健悟, 中野 正和, 田代 啓, 木下 茂. 落屑緑内障患者における血液生化学的データの解析. 第 24 回日本緑内障学会. 2013. 9. 22. 東京
6. 池田 陽子, 森 和彦, 上野 盛夫, 吉川晴菜, 加藤 浩晃, 丸山 悠子, 木下 茂. 正常者前房隅角因子の加齢による減少スピードの検討. 第 67 回日本臨床眼科学会. 2013. 11. 1. 横浜
7. 池田 陽子, 森 和彦, 上野 盛夫, 吉川 晴菜, 丸山 悠子, 木下 茂. 線維柱帯切除術後のプロスタグランジン製剤点眼中止に伴う中心角膜厚変化の検討. 第 37 回 日本眼科手術学会総会 2014. 1. 17-19 京都

〔図書〕(計 2 件)

1. 池田 陽子, 中野 正和. 緑内障診療クローズアップ. 緑内障診療の基本. 緑内障に関連する遺伝子. p6 - 11. メジカルビュー. 東京. 2014
2. 池田 陽子, 森 和彦. All About 開放隅角緑内障. 開放隅角緑内障の遺伝要因と遺伝相談. p132-143. 医学書院、東京、2013

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 :

池田 陽子(IKEDA, Yoko)
京都府立医科大学医学研究科・客員講師
研究者番号 : 00433243

(2) 研究分担者

田代 啓(TASHIRO, Kei)
京都府立医科大学医学研究科・教授
研究者番号 : 10263097

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

森 和彦(MORI, Kazuhiko)
京都府立医科大学医学研究科・講師
研究者番号 : 40252001

中野 正和(NAKANO, Masakazu)
京都府立医科大学医学研究科・准教授
研究者番号 : 70381944

(3) 連携研究者

今井 浩二郎(IMAI, Kojiro)
京都府立医科大学大学院医学研究科 医療フロンティア展開学・講師
研究者番号 : 70728443