

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 2 4 年 4 月 1 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659811

研究課題名（和文） 家系内 SNP 解析による斜視遺伝子座の絞込みと候補遺伝子の特定

研究課題名（英文） Narrowing of strabismus susceptibility loci by SNP analysis using family members

研究代表者

松尾 俊彦 (MATSUO TOSHIHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90211565

研究成果の概要（和文）：

55 家系の斜視家系を対象として、今までに斜視関連遺伝子座位として絞り込んだ 2 箇所の染色体座位である 4q28.3 と 7q31.2 をさらに狭めるため、それらの座位の SNP 計 400 個を使って、55 家系を対象としてタイピングを行った。SNP の解析には、岡山大学医学部共同実験室に新規に導入された質量分析計を使った。家系内の斜視患者の群と正常者の群の 2 群に分けて、2 群の間で関連解析を行い、両群の間で有意な偏りがみられる SNP を検出した。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed 400 SNPs in two chromosomal loci, 4q28.3 and 7q31.2, which were discovered by our previous studies. The SNPs were typed with mass array in the Central Research Laboratories of Okayama University Medical School. We divided families members into two groups: patients with strabismus and other members with no diseases and compared the SNPs to find the significant difference between the two groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	2,400,000	720,000	3,120,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼遺伝学 SNP 斜視 遺伝子座

1. 研究の背景と今までの成果

斜視は、両眼の視線がずれている状態をいい、大別して、「共同性斜視」と「麻痺性（非共同性）斜視」がある。「共同性斜視」は、視線の方向によって斜視の程度（斜視角）が変わらず、一方、「麻痺性斜視」は、視線の方向によって斜視の程度が変わる。

「共同性斜視」には、内斜視、外斜視、上下斜視（垂直方向の眼位ずれ）があり、さらに、内斜視には、乳児内斜視、調節性内斜視、部分調節性内斜視、後期発症（急性発症）内斜視、微小斜視がある。「麻痺性斜視」には、神経原性と筋原性斜視がある。「麻痺性斜視」は、先天性と後天性にも分類できる。先天性疾患としては、「先天上斜筋麻痺」と「先天外眼筋線維症」があり、後天性疾患としては、虚血や圧迫による眼球運動神経麻痺による斜視、甲状腺眼症や重症筋無力症などによる斜視がある。

「共同性斜視」の原因はわかっていないが、遺伝が深く関与していることは、以下の点から明らかである。

- 1) 斜視は幼少期に発症する
- 2) 斜視患者では家族歴の頻度が高い／斜視家系が存在する
- 3) 一卵性双生児では、二卵性双生児と比べて斜視の表現型の一致率が高い

共同性斜視の頻度は、小学生の約 1%が内斜視や外斜視をきたしていて、遺伝性疾患としては、頻度が高い。

2000 年 2 月、「斜視の遺伝子座を解明する基礎研究」として、岡山大学医学部倫理委員会承認され、共同性斜視の遺伝子座を明らかにする研究を始めた。患者、家族、正常対

照者から末梢血 10ml を採血し、白血球ゲノム DNA を分離し、全染色体の 400 箇所マイクロサテライト領域を PCR によって増幅し、電気泳動によって増幅 DNA 長を測定し、遺伝統計学的手法を使って遺伝子座を探った。斜視の 30 家系を対象とした解析結果は、下記の論文として公表している。染色体上に何箇所か可能性のある部位が見つかった。

Fujiwara H, Matsuo T, Sato M, et al. Genome-wide search for strabismus susceptibility loci. Acta Medica Okayama 2003;57:109-116.

私たちの発表と時を同じくして、アメリカの内斜視の大きな 1 家系を解析し、7 番染色体短腕 7p22.1 が遺伝子座として発表された。Parikh V, Shugart YY, Doheny KF, et al. A strabismus susceptibility locus on chromosome 7p. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:12283-12288.

私たちは、斜視家系をさらに集め、患者・家族の協力を得て、2008 年には、55 家系を対象とした解析を完了した。その結果、新たな遺伝子座として、4 番染色体長腕 4q28.3 と 7 番染色体長腕 7q31.2 を発見した。また、アメリカの 1 つの内斜視家系で報告された 7 番染色体短腕 7p22.1 は、内斜視の家系に限定して解析条件（浸透率、疾患アレル頻度）を変えると、可能性のある遺伝子座として再現できた。この結果から、共同性斜視には複数の遺伝子座が関与することが初めて明らかになった。

Shaaban S, Matsuo T, et al. Chromosomes 4q28.3 and 7q31.2 as new susceptibility loci for comitant strabismus. Investigative Ophthalmology & Visual

Science 2009;50:654-661.

Shaaban S, Matsuo T, et al. Investigation of parent-of-origin effects in comitant strabismus using MOD-score analysis. Molecular Vision 2009;15:1351-1358.

今まで8年間継続した斜視遺伝子の解明に向けての研究をさらに進展させて、研究期間の最後には、斜視遺伝子候補を特定することを目標にしている。世界的にみても、斜視遺伝子の解明に向けて長期に渡って努力しているのは、アメリカの1研究室、イギリスの1研究室、および、私たちの研究室しかなく、独創性が高い。斜視は、両眼視機能の異常と捉えることができ、斜視遺伝子は、両眼視に関与する脳機能を解明する第一歩になりうる。

2. 研究の目的

私たちは、現在まで斜視家系を集め、患者・家族の協力を得て、2008年には、55家系を対象とした解析を完了した。その結果、新たな遺伝子座として、4番染色体長腕4q28.3と7番染色体長腕7q31.2を発見した。この研究によって、この2つの遺伝子座をさらに狭め、斜視遺伝子候補を特定することを目標にした。

3. 研究の方法

55家系の斜視家系を対照して、今までに斜視関連遺伝子座位として絞り込んだ2箇所の染色体座位である4q28.3と7q31.2をさらに狭めるため、それらの座位のSNP計400個を使って、55家系を対象としてタイピングを行った。SNPの解析には、岡山大学医学部共同実験室に新規に導入された質量分析計を使った。家系内の斜視患者の群と正常者の群の2群に分けて、2群の間で関連解析を行い、

両群の間で有意な偏りがみられるSNPを特定した。

2000年2月、岡山大学医学部倫理委員会で承認された「斜視の遺伝子座を解明する基礎研究」の方法、手順にしたがって、斜視家系の正常者および斜視患者、あるいは、対照としての正常者、斜視患者から収集したゲノムDNAを試料として用いた。

具体的には、文書による説明と同意取得の後、末梢血10mlを採血し、密度勾配遠心法によって白血球を分離し、SDSを含むトリス緩衝液で白血球を溶解し、Proteinase K処理で蛋白を分解し、クロロホルム/フェノール分配法によってDNAを抽出し、エタノールによりDNAを析出させた。抽出DNAは、その濃度を測り、連続番号によって匿名化して、-30度冷凍庫に保存した。

55家系の斜視家系の斜視患者と正常者を対象として、染色体座位4q28.3と7q31.2の2箇所について、それぞれ100箇所と300箇所のtagSNPを選定して、SNPタイピングを行った。SNPタイピングは、岡山大学医学部共同実験室に新規に導入された質量分析法に基づくSNP解析器(Sequenom社)を使った。補助金の申請金額の主体は、SNP解析のための消耗品が占めた。

4. 研究成果

ゲノム関連解析では、家系内で斜視の表現型を示す群と、斜視の表現型を示さない群に分けて遺伝子多型の頻度を比較する統計解析を行い、疾患感受性遺伝子座(斜視関連遺伝子座)を特定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

Ohkubo SI, Matsuo T, Hasebe K, Shira YH, Itoshima E, Ohtsuki H. Phenotype-phenotype and genotype-phenotype correlations in patients with idiopathic superior oblique muscle palsy. Journal of Human Genetics 2012;57:122-129. (査読有り)

〔学会発表〕（計1件）

①松尾俊彦, 大久保小百合, 大月洋. 特発性（先天性）上斜筋麻痺の遺伝型と表現型との関係. 日本人類遺伝学会第56回大会. 2011年11月9日～12日 千葉市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 俊彦 (MATSUO TOSHIHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90211565

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者