

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592636

研究課題名(和文) カスタムチップを用いた既知の原発開放隅角緑内障関連遺伝子に対する候補遺伝子解析

研究課題名(英文) Candidate gene analysis of well-known genes in primary open-angle glaucoma patients utilizing custom-made gene chip

研究代表者

森 和彦 (MORI, Kazuhiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40252001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、我々が過去15年以上にわたって蓄積し新たに独自のデータベースとして構築する事に成功した臨床情報と4,000例を超える連結可能匿名化ゲノム情報をもとに、原発開放隅角緑内障(POAG)患者と健康者のデータから厳選した609個の一塩基多型(SNP)についてケース・コントロール解析を行い、新たなSNPの日本人POAGへの関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed a case-control analysis in 609 single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are selected from our original clinical database collected for more than 15 years and from our genomic information of more than 4000 cases, between primary open-angle glaucoma (POAG) patients and normal controls, and found several new SNPs that related to Japanese POAG patients.

研究分野：ゲノム医科学

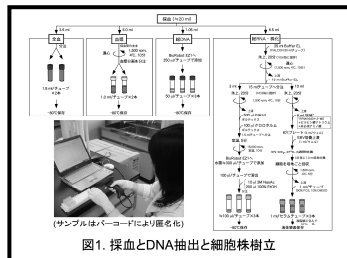
キーワード：眼遺伝学

1. 研究開始当初の背景

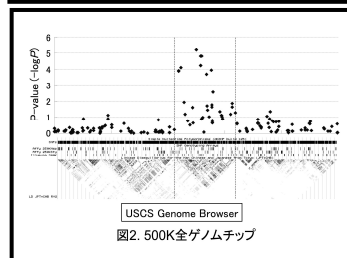
緑内障はわが国において2型糖尿病と同程度に高い有病率(40歳以上の5.0%;多治見スタディ¹⁾)を有し、中途失明原因の第1位を占める極めて重要な眼疾患である。わが国においては主病型の原発開放隅角緑内障(POAG)の中でも、正常眼圧緑内障の占める割合が非常に多いことが明らかとなっており、疫学的にも人種差の存在が指摘されている。また緑内障発症の危険因子の1つとして家族歴があり、遺伝的要因が発症に関与することが示唆されていた。

これまでの家系を用いた連鎖解析の結果、POAGの原因遺伝子としてMYOC²⁾、OPTN³⁾、WDR36⁴⁾をはじめとして数多くの遺伝子が報告されているが、実際にはこれらの遺伝子が関与するのは一般集団における全POAG患者の5-10%程度に過ぎないことが明らかとなっていた⁵⁾。

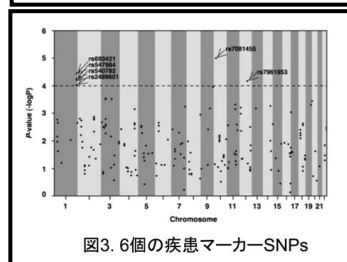
われわれは過去6年間にPOAG患者および正常対照者4,000名に対して眼科的精密検査施行後に末梢血を採取、DNA、RNA、血漿を抽出し



て不死化細胞株を樹立するとともに、そのうちの境界例等を除いた1,575例についてゲノムワイド



ド関連解析(図1, 2)を行った。その結果、日本人における緑内障の疾患マーカーとして有意な3領域



6SNPsを同定(図3)し、米国アカデミー紀要に発表した⁶⁾。

その後2010年にアイスランド等のグループによる表向きはPOAG 1,263例、対照 34,877例と主張された大規模なゲノムワイド関連解析の結果、Caveolinが新たなPOAG関連疾患マーカー遺伝子として同定された⁷⁾。しかしながらこの研究では対照群に対して眼科的精密検査を行っていないことから完全に緑内障患者を排除しているとは言い切れず、数%程度は混入している可能性が高い。さらに指摘されたCaveolin SNP自体に関しても白人に

おいてはSNPとして存在しているが、日本人においてはSNPではないことが判明しており、ここにも人種差の存在が浮き彫りとなった。

以上が日本人集団におけるPOAG関連疾患マーカーとしての真の原因SNP解析の背景である。遺伝的要因の探索においては常に人種差の影響を考慮する必要があり、ある程度遺伝的に均質な日本人を対象とし、厳密な対照群をもとに統計的な検出力を担保できる数を用いた大規模なケース・コントロール解析を行うことが、日本人の真の疾患原因遺伝子SNP発見のためには重要であると考えられた。

2. 研究の目的

緑内障はわが国における中途失明原因第1位の眼疾患である。緑内障関連遺伝子としてはMYOC、OPTN、WDR36をはじめ20以上の遺伝子が過去に報告されているが、未だ日本人における真の緑内障原因遺伝子は発見されていない。我々は過去15年以上にわたって蓄積された臨床情報と4,000例を超える連結可能匿名化ゲノム情報をもとに日本人を対象とした原発開放隅角緑内障(POAG)のゲノムワイド関連解析研究を行い、有意な6SNPを報告した(Nakano et al. PNAS 2009)。本研究では、POAG患者と健常者を用いて既知の緑内障関連遺伝子上のSNPについて大規模なケース・コントロール解析を行い、これら遺伝子の日本人POAGへの関与を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

原発開放隅角緑内障(POAG)の関連候補遺伝子の効果的な解析のために、まず熟練した緑内障専門医により各症例を継続的に診断及び収集を行った。その過程で得られた情報を元に、緑内障解析用の検体編成の最適化を適宜行いつつ、正常眼圧緑内障(NTG)及び高眼圧緑内障(HTG)の症例集団も合わせて設定を行った。

これらの症例集団の各ゲノムDNAは、最初のスクリーニング(1st)と追試確認(2nd)の2つのステージ分が用意され、いずれもイルミナ社製のDNAアレイ「iSelect」にてハイブリダイゼーションを行った。これは実験者が解析を行いたい塩基多型(Single Nucleotide Polymorphisms、SNPs)を自由に選択して設計可能なカスタムDNAアレイであり、本研究では過去に緑内障に関連すると報告のある遺伝子やSNPsを膨大な文献から調査し可能な限り搭載した。ハイブリダイゼーションされたDNAアレイは、各ジェノタイプに応じたシグナルを専用の蛍光スキャナにより取り込み、イルミナ社製解析ソフトウェア「Bead Studio」上で精査され、各症例・SNPのジェノタイプを確定させた。

全ジェノタイプデータは、本研究専用のデータ解析・保存システムを用いて各サーバーやPC上で整理を行った。その後ジェノタイプデータは適切なファイル形式に変換され、国際的にゲノム研究の分野で使用されている統合的解析ソフト「PLINK」、各遺伝子座位における局所的な

SNPs 間の関係を調べる「Haploview」、統計ソフト「R」等を用いて、データの品質管理を行いつつ多角的な解析を行った。

4. 研究成果

まず本研究開始時点より基礎的な解析と平行して収集して来た症例について、その過程で得られた詳細かつ膨大な匿名化済みの臨床検体情報を新たに独自のデータベースとして構築する事に成功した。これを用いる事により、従来の臨床検体情報を最新の診断結果により再検証する事が可能となった。また、左右の眼における診断の違いやより細分化された症例の検証なども容易に行える様になった。再検証の代表例を表.1 に示す。

表.1 基礎解析開始時点での NTG301 症例の最新診断結果における内訳

右眼\左眼	HTG	NTG	その他
HTG	10	0	1
NTG	1	252	9
その他	1	16	11

表.1 は、過去に実施した予備検討の解析でケースとして扱われていた POAG 症例内において、初診時には NTG 症例集団としていた 301 検体を最新の診断結果を基に左右の眼別に集計し直した代表例である。この表より、NTG であったが継続的な診断により HTG へ移行した 10 例など、より検体の真の症例を反映していると考えられる事例が多数確認された。

この例の様に、本研究開始当初から実施した予備的な基礎解析結果を数年の研究期間内に蓄積した最新の知見を利用して改善し精度を高めるために、全面的な見直し作業を敢行した。その対象には、基礎検討の最初期に除外されていた症例や同一検体のハイブリダイゼーションやり直し分も含めて、本研究が所有する 1st Stage で延べ 1,097 症例分、2nd Stage で延べ 1,007 症例分の全カスタム DNA アレイのジェノタイプデータに対し再検証を行った。

一方、そのカスタム DNA アレイに搭載する SNPs は、広く何度も追試されて来た物だけではなく、生化学的機序の重要性や、昨今のゲノムワイド関連解析では直接関連性は示唆されていないものの、それらの手法では低アレル頻度等により解析対象外とされうる可能性のある変異も見落とさない様に精査を行った。その結果、1st ステージのカスタム DNA アレイ用に 49 報以上の専門誌等の論文より緑内障関連候補とされる 24 遺伝子を抽出し、その内訳を表.2 にまとめた。

表.2 解析対象の緑内障関連候補遺伝子

遺伝子	Locus	搭載 SNP 数
<i>MTHFR</i>	1p36	29
<i>NPPA</i>	1p36	12
<i>GSTM1</i>	1p13	12
<i>MYOC</i>	1q24	55

<i>OCLM</i>	1q25	5
<i>OPTC</i>	1q32	6
<i>CYP1B1</i>	2p22	53
<i>IL1A</i>	2q14	14
<i>IL1B</i>	2q14	11
<i>OPA1</i>	3q29	21
<i>EDNRA</i>	4q31	33
<i>WDR36</i>	5q22	62
<i>ADRB2</i>	5q32	28
<i>TNF</i>	6p21	31
<i>TAP1</i>	6p21	17
<i>CDKN1A</i>	6p21	16
<i>NOS3</i>	7q36	19
<i>OPTN</i>	10p13	34
<i>ADRB1</i>	10q25	22
<i>IGF2</i>	11p15	42
<i>TP53</i>	17p13	43
<i>OLFM2</i>	19p13	8
<i>APOE</i>	19q13	22
<i>GSTT1</i>	22q11	14
合計		609 SNPs

これらには、1 つの遺伝子内に複数の関連候補 SNPs の報告がある物や、異なる名称を用いて説明されているものの周辺塩基配列等を参考に同一 SNP と確認された物など重複を整理してまとめている。また、各遺伝子のエクソン内でアミノ酸残基の変異を伴う既知の SNP や、発現等に影響を与えうるプロモーター領域の SNP なども含めて解析対象にしている。ただし、カスタム DNA アレイの製造過程やハイブリダイゼーションに用いる塩基配列の特異性等の問題で、実際に解析対象候補とした SNP 数よりも DNA アレイ上の搭載に成功した表.2 中の数字の方が若干少なくなっている。

これら再検証結果とカスタム DNA アレイの準備を踏まえて、症例の判断基準の厳密さによって数種類の再解析の検討を行った。表.3 は、片眼もしくは両眼で NTG 又は HTG のみを発症し他の併発は見られないという最も厳格な判断基準の場合の症例集団編成例である。

表.3 症例集団の編成例

ステージ	症例	整理前	整理後
1st	POAG	445	443
	HTG	169	168
	NTG	276	275
	Control	537	515
2nd	POAG	417	400
	HTG	220	211
	NTG	197	189
	Control	391	385

表.3 中の症例集団の内、POAG は HTG と NTG を合わせた物である。また、「整理前」は臨

床検体情報データベースを元に抽出した集団であるが、この中には「PLINK」を使用した予備解析を行った際に、ジェノタイプデータ上から統計解析の結果に誤った偏りを与え得る強い血縁関係等が示唆された者も含まれる。それらを取り除いた結果が表中の「整理後」になり、この過程で匿名化された臨床情報を利用しても解析データの品質管理が適切になされる事が確認された。

上記の症例集団を用いて様々な解析を実施するが、その際に要注意となる結果例を表.4 に示す。この表中の P 値はジェノタイプ頻度の比較に対するカイ二乗検定の値であり、また 4 つの SNPs はいずれも WDR36 上にあるため同一のハプロタイプを示唆する様な似た傾向を見せている。4 SNPs とも全ケース集団を示す POAG では $P < 0.05$ の有意差を見せており、また rs13153937 以外は NTG でも有意差を見せている。ただし、オッズ比 (OR) を見れば 95%信頼区間 (CI) の上限と下限が全てで 1.00 を跨いでいる事に留意すると積極的に差があるとは言えない。この様に、多数の症例と SNPs を用いた本研究の解析ではある面では有意に差がある事を示唆する結果についても別の面で注意を要する事が少なからず有り、多角的な解析の検証が必要であると解った。

以上の事を踏まえて、表.3の症例集団を用いた 1st ステージの解析結果より信頼性の高いアレル頻度関連解析の結果を表.5 にまとめる。

表.4 ジェノタイプ関連解析の結果例

SNP ID	症例	P 値	OR (95%CI)
rs1993465	POAG	0.03	1.12 (0.92-1.35)
	HTG	0.33	1.09 (0.84-1.41)
	NTG	0.03	1.14 (0.91-1.41)
rs13153937	POAG	0.04	1.12 (0.92-1.36)
	HTG	0.23	1.13 (0.86-1.47)
	NTG	0.06	1.12 (0.89-1.39)
rs6859041	POAG	0.03	1.12 (0.92-1.35)
	HTG	0.33	1.09 (0.84-1.41)
	NTG	0.03	1.14 (0.91-1.41)
rs2034896	POAG	0.03	1.12 (0.93-1.36)
	HTG	0.31	1.09 (0.84-1.41)
	NTG	0.03	1.14 (0.92-1.42)

表.5 アレル頻度解析結果の例

SNP ID	症例	P 値	OR(95%CI)
rs751621 (OPTC)	POAG	0.22	1.13 (0.93-1.38)
	HTG	0.69	0.95 (0.73-1.24)
	NTG	0.04	1.27 (1.01-1.61)
rs1078839 (OPTC)	POAG	0.20	1.13 (0.94-1.37)
	HTG	0.58	0.93 (0.72-1.20)
	NTG	0.03	1.29 (1.03-1.61)
rs1042720 (ADRB2)	POAG	0.01	1.28 (1.06-1.54)
	HTG	0.22	1.17 (0.91-1.52)
	NTG	0.01	1.35 (1.09-1.67)

rs1549758	POAG	0.06	1.30 (0.99-1.70)
(NOS3)	HTG	0.03	1.49 (1.05-2.12)
	NTG	0.31	1.18 (0.86-1.62)

表.5 中の太字のものが、アレル頻度の比較に対するカイ二乗検定結果の P 値であり、OR の 95%CI と見比べても有意差があると考えられる。ただし、これらの結果の内 POAG で $P < 0.05$ となっているものは rs1042720 のみであり、その他は HTG または NTG での関連解析結果である。表.3 に示した通り、HTG と NTG は POAG に比べて症例集団規模が少なくなるため、わずかな症例数の差が統計的な解析結果を左右する事がある。実際に前述の表.4 の場合も、より傾向の差が出やすいジェノタイプ関連解析結果であるがために判明した事である。こうした解析結果の精度を高めるため、現在 2nd ステージの症例集団による解析結果と同時に、多角的な解析で結果を補強する解析システムの構築を行い、運用を進めているところである。

本研究では、独自の臨床検体情報データベースの構築と検証を重ねたジェノタイプデータを有する事に成功した事で、これらの様な細かい問題の把握と対処への道筋を付ける事が出来た。本研究の成果は、過去に緑内障の関連候補とされた遺伝子と、現在進行形の他の研究に重要な知見を与える物と考えられる。

< 引用文献 >

- Iwase A, et al. Ophthalmology, 2004. 111 (9): p.1641-8.
 Stone EM, et al. Science, 1997. 275 (5300): p.668-70.
 Rezaie T, et al. Science, 2002. 295 (5557): p.1077-9.
 Monemi S, et al. Hum Mol Genet, 2005. 14 (6): p.725-33.
 Fan BJ, et al. Clin Biochem, 2006. 39(3): p.249-58.
 Nakano M, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2009. 106(31): p.12838-42.
 Fan BJ, et al. Mol Vis, 2009. 15: p.646-53.

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 3 件)

- Nakano M, Mori K, et al. Novel common variants and susceptible haplotype for exfoliation glaucoma specific to Asian population. Sci Rep, 有, 4, 2014, 5340
Maruyama Y, Mori K, et al. Morphological analysis of age-related iridocorneal angle changes in normal and glaucomatous cases using anterior segment optical coherence tomography. Clin Ophthalmol, 有, 8, 2014, 113-8
<http://dx.doi.org/10.2147/OPHTH.S5237>

0

Nakano M, Mori K, et al. Common variants in CDKN2B-AS1 associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by genome-wide association studies in Japanese. PLoS ONE, 有, 7, 2012, e33389 doi:10.1371/journal.pone.0033389

[学会発表](計 9 件)

Mori K. Genetics in normal tension glaucoma. Asia ARVO, 2015/2/17, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Nakano M, Mori K, et al. Genome-wide association study of exfoliation syndrome/exfoliation glaucoma in a Japanese population. Annual meeting of American Society of Human Genetics, 2014/10/18-22, San Diego (USA)

Ikeda Y, Mori K, et al. Evaluation of the age-related speed of anterior chamber reduction by 3D Scheimpflug camera in Japanese normal subjects. American Academy of Ophthalmology, 2013/11/16-20, New Orleans (USA)

Ikeda Y, Mori K, et al. Analysis of ophthalmic clinical data association for CDKN2BAS-1 genotype in normal subjects. 5th World Glaucoma Congress, 2013/7/17-20, Vancouver (Canada)

Ueno M, Mori K, et al. Analysis of hematological and biochemical data in normal tension glaucoma patients. Annual meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013/5/7-11, Seattle (USA)

Maruyama Y, Mori K, et al. Analysis of hematological and biochemical data in primary open-angle glaucoma patients. Asia Pacific Glaucoma Congress, 2012/12/7-9, Bali (Indonesia)

Nakano M, Mori K, et al. Common genetic variants of primary open-angle glaucoma in Japanese population. 62th annual meeting of American Society of Human Genetics, 2012/11/6-10, San Francisco (USA)

Ikeda Y, Mori K, et al. Association of the risk alleles of glaucoma marker SNPs with morphological characters of the optic disc. 10th congress of European Glaucoma Society, 2012/6/18-22, Copenhagen (Denmark)

Mori K, Ikeda Y, et al. Genome-wide association study on primary open-angle glaucoma with a 1000K gene chip. Annual meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2012/5/6-10, Fort Lauderdale (USA)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森 和彦 (MORI, Kazuhiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 40252001

(2)研究分担者

松田 彰 (MATSUDA, Akira)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 00312348

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

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

木下 茂 (KINOSHITA, Shigeru)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 30116024

上野盛夫 (UENO, Morio)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 40426531

中野正和 (NAKANO, Masakazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 70381944