

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462725

研究課題名(和文) 網膜格子状変性の発症に関わるCOL4A4遺伝子の詳細なゲノム解析

研究課題名(英文) Comprehensive genetic analysis of the COL4A4 gene region for lattice degeneration of the retina

研究代表者

西出 忠之(Nishide, Tadayuki)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：90347344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：網膜格子状変性とは、眼球の赤道部から周辺部網膜において、鋸状縁と平行に走る紡錘形の境界不鮮明な菲薄化した網膜変性のことである。本研究では、日本人集団を用いて、網膜格子状変性の候補遺伝子であるCOL4A4(collagen type IV alpha 4)遺伝子を対象に網羅的な遺伝子解析を実行し、網膜格子状変性と最も顕著に相関するSNP(single nucleotide polymorphism：一塩基多型)をCOL4A4遺伝子のイントロン領域に見出した。

研究成果の概要(英文)：Lattice degeneration of the retina is a vitreoretinal disorder characterized by focal retinal thinning associated with liquefaction of the overlying vitreous gel and with firm vitreoretinal adherence to the margins of the lesions. Since it has been suggested that the collagen type IV alpha 4 (COL4A4) gene may contribute to the development of lattice degeneration of the retina, we performed a comprehensive genetic analysis of the COL4A4 gene region. This study found that some COL4A4 variants were significantly associated with the disease and that the strongest associated SNP is in the intron region of COL4A4.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜格子状変性 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜格子状変性とは、眼球の赤道部から周辺部網膜において、鋸状縁と平行に走る紡錘形の境界不鮮明な菲薄化した網膜変性のことであり、その特徴として、限局性網膜菲薄化、隣接硝子体ゲルの液化、および変性巣周縁での網膜と硝子体の強固な癒着が挙げられる。

(2) 網膜格子状変性では、変性巣周縁に付着した硝子体が後部硝子体剥離形成時に強く網膜を牽引しているため、外部衝撃や加齢により変性巣の周縁に網膜裂孔や網膜剥離を形成することもあり、網膜剥離人口の約半数がこの網膜格子状変性に起因していると言われている。また、網膜格子状変性を保有することで、網膜剥離を発症するリスク(相対危険率)が約 10 倍になることも明らかになっている。加えて、網膜格子状変性はジストロフィの一所見として現れることも報告されている。

(3) 網膜格子状変性は稀な疾患ではなく、本邦のみならず全世界で観察され、網膜格子状変性の発症頻度に民族間差が見られず、全人口の 1 割程度が罹患していると考えられている。しかしながら、網膜格子状変性は自覚症状が全くないため、健康診断や通常の眼科診察では見落とされやすく、重度の視力低下が懸念される網膜裂孔や網膜剥離を発症してから初めて知るケースがほとんどである。そのため、網膜格子状変性の予防、あるいは網膜格子状変性の迅速かつ簡便な診断法を確立することは、世界的に見ても大変意義深いといえる。

(4) しかしながら、多因子遺伝性疾患であると考えられる網膜格子状変性の発症を左右する危険因子(疾患感受性遺伝子)に関する研究は数少なく、未だ疾患感受性遺伝子の特定には至っていないため、疾患の予防および早期発見・早期治療は遅々として進展していない。

(5) 私たちは、すでに日本人集団(網膜格子状変性患者 574 検体、健常者 608 検体)を対象としたゲノム全域を対象とした相関解析(genome-wide association study (GWAS): ゲノムワイド関連解析)を完了しており、網膜格子状変性と有意に相関する遺伝子として COL4A4 (collagen type IV alpha 4) 遺伝子を見出している(PLoS One 2012; 7(6): e39300.)。

(6) しかしながら現時点では、COL4A4 遺伝子内に多くあると推測される遺伝子変異のいずれが最も重要に網膜格子状変性の発症に関与しているのか、また COL4A4 遺伝子が網膜格子状変性の発症機序・病態にどのように関与しているのかは不明なままであ

る。

(7) したがって、網膜格子状変性の発症に最も重要に関与する COL4A4 遺伝子内の変異(責任遺伝子変異)を特定し、網膜格子状変性の発症機序・病態を解明することは大変意義深いと言える。

2. 研究の目的

(1) 本研究において COL4A4 遺伝子を対象に詳細な遺伝子解析を実行し、網膜格子状変性の発症に関わる責任遺伝子変異を特定する。

(2) 特定した遺伝情報をもとに COL4A4 遺伝子の介する網膜格子状変性の発症機序を明確にする。

(3) 本研究の成果は、遺伝要因を対象とした網膜格子状変性の新規治療薬の開発につながり、その医学的意義は大変高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 私たちの GWAS(PLoS One 2012; 7(6): e39300.)では、COL4A4 遺伝子のイントロン 20 からイントロン 41 の間のおよそ 60kb の領域に網膜格子状変性との顕著な相関が認められたため、本研究では、この 60kb の領域に位置する 21 個のエクソン(エクソン 21~エクソン 41)のダイレクトシーケンシングを行い、網膜格子状変性と相関する遺伝子変異を検出する。エクソン領域はゲノム全体の約 1%ほどであるが、タンパク質に翻訳される領域であるため、機能的に重要な領域である。

(2) 本シーケンシング解析では、日本人網膜格子状変性患者 574 検体と日本人健常者 608 検体を対象とし、Applied Biosystems 社のキャピラリーシーケンサー(3730 DNA Analyzer)を用いて、エクソン領域のシーケンシングを系統的に実行する。実験は Applied Biosystems 社のプロトコルを準拠して行う。

(3) 本研究では、COL4A4 のエクソン領域の解析に加えて、イントロン領域および非翻訳領域についても網羅的な解析を実行する。イントロン領域および非翻訳領域は、タンパク質に翻訳されない領域であり、イントロン領域および非翻訳領域内の遺伝子変異が遺伝子の機能に直接影響を与えることはないものの、遺伝子発現量の制御に関与することが知られている。

(4) イントロン領域および非翻訳領域の網羅的な遺伝子解析では、Imputation 法を用いる。私たちはすでに本領域内の 34 個の SNP(single nucleotide polymorphism: 一

塩基多型)について、本研究で用いる日本人集団(網膜格子状変性患者 574 検体と健常者 608 検体)における遺伝子型情報を得ているため(PLoS One 2012; 7(6): e39300.)、本 Imputation 解析ではそれら遺伝子型情報を活用する。まず初めに、1000 Genomes Project (1000 人ゲノムプロジェクト) (<http://www.1000genomes.org/>) の東アジア人集団(日本人集団(JPT)、中国北京の漢民族集団(CHB)および中国南方の漢民族集団(CHS))のリファレンスデータを用いて、対象領域内に存在するすべての未解析 SNP の遺伝子型の推測(Imputation)を行う。Imputation 解析は、MACH v.1.0.16 ソフトウェア(ミシガン大学、<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/MACH/tour/imputation.html>)を用いて実行する。

(5) その後、Imputation 法により見出された SNP について、患者・健常者間の相関解析を実行し、網膜格子状変性と最も強固な相関を示す SNP を同定する。同定された SNP について、TaqMan アッセイを用いて患者および健常者の実際の遺伝子型判定を行い、網膜格子状変性との相関性を最終確認する。TaqMan アッセイは Applied Biosystems 社のプロトコールに準拠して行う。

(6) エクソン領域を対象としたシーケンシング解析とイントロン領域および非翻訳領域を対象とした Imputation 解析の結果を比較し、網膜格子状変性と最も強固な相関を示す遺伝子変異を特定する。

(7) COL4A4 のイントロン領域において、最も強固な相関を示す SNP が認められる(研究成果内にて後述)。イントロン領域内の遺伝子変異は、遺伝子発現量の制御に関与することが知られているため、本研究では、同定した SNP と COL4A4 遺伝子の発現量の関連を調査する。本遺伝子発現解析では、リアルタイム RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法を用いて遺伝子の発現量を定量し、SNP の遺伝子型の変動における遺伝子発現量の比較を実行する。本遺伝子発現解析は Applied Biosystems 社のプロトコールに準拠して行う。

(8) 本研究では、すべての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報は連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

(9) 本研究に参加するすべての検体提供施設は、各々の施設の倫理委員会より本遺伝子研究への参加を承認されている。

4. 研究成果

(1) 日本人集団(網膜格子状変性患者 574 検体と健常者 608 検体)を対象としたエクソン領域のダイレクトシーケンシングを実行し、エクソン領域内の遺伝子変異を網羅的に検出した。

(2) さらに、同一の日本人集団を対象に、イントロン領域および非翻訳領域の Imputation 解析を実行し、両領域に位置する計 734 個の SNP の遺伝子型情報を取得した。

(3) (1)および(2)で取得した遺伝子変異について、患者・健常者間の相関解析を実行した結果、COL4A4 遺伝子のイントロン領域に位置する SNP において網膜格子状変性の発症リスクとの最も強固な相関が認められた($P=0.000014$ 、オッズ比=1.43 (95%信頼区間=1.22-1.69))。

(4) 同定した SNP を対象に、COL4A4 遺伝子の発現量解析を実行した結果、SNP のリスクアレルが COL4A4 遺伝子の発現量を有意に減少させることが分かった($P=0.0000066$)。

(5) 以上より、COL4A4 遺伝子のイントロン領域内の SNP を介した COL4A4 遺伝子の発現量の低下が網膜格子状変性に関与することが推測された。本研究の成果により、網膜格子状変性の発症メカニズムの解明が大きく進展することが期待される。

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 10 件)

Kanemaki N, Meguro A, Yamane T, Takeuchi M, Okada E, Iijima Y, Mizuki N. Study of association of PAX6 polymorphisms with susceptibility to high myopia in a Japanese population. Clin Ophthalmol. 2015; 9: 2005-2011. 査読有
DOI: 10.2147/OPHTH.S95167.

Oguchi T, Ota M, Ito T, Hamano H, Arakura N, Katsuyama Y, Meguro A, Kawa S. Investigation of susceptibility genes triggering lachrymal/salivary gland lesion complications in Japanese patients with type 1 autoimmune pancreatitis. PLoS One. 2015; 10(5): e0127078. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0127078.

Bakir-Gungor B, Remmers EF, Meguro A, Mizuki N, Kastner DL, Gul A, Sezerman OU. Identification of possible pathogenic pathways in Behçet's disease using genome-wide association study data from two different populations. *Eur J Hum Genet.* 2015; 23(5): 678-687. 査読有
DOI: 10.1038/ejhg.2014.158.

Nishide T, Hayakawa N, Kimura I, Nakanishi M, Yagi Y, Shibuya E, Mizuki N. Postoperative refractive error following cataract surgery after the first attack of acute primary angle closure. *Int Ophthalmol.* 2014; 34(4): 805-808. 査読有

URL:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10792-013-9878-4>

Nishide T, Hayakawa N, Nakanishi M, Ishii M, Okazaki S, Kimura I, Shibuya E, Mizuki N. Reduction in choroidal thickness of macular area in polypoidal choroidal vasculopathy patients after intravitreal ranibizumab therapy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013; 251(10): 2415-2420. 査読有
DOI: 10.1007/s00417-013-2419-z.

Nishide T, Hayakawa N, Nakanishi M, Ishii M, Kimura I, Shibuya E, Nomura E, Mizuki N. Preoperative factors associated with improvement in visual acuity after globe rupture treatment. *Eur J Ophthalmol.* 2013; 23(5): 718-722. 査読有
DOI: 10.5301/ejo.5000252.

Nishide T, Nakanishi M, Hayakawa N, Kimura I, Mizuki N. Cataract surgery for tilted lens in peters' anomaly type 2. *Case Rep Ophthalmol.* 2013; 4(3): 134-137. 査読有
DOI: 10.1159/000354611.

Yoshida M, Meguro A, Okada E, Nomura N, Mizuki N. Association study of fibroblast growth factor 10 (FGF10) polymorphisms with susceptibility to extreme myopia in a Japanese population. *Mol Vis.* 2013; 19: 2321-2329. 査読有

URL:

<http://www.molvis.org/molvis/v19/2321/>

Kanemaki N, Tchedre KT, Imayasu M, Kawarai S, Sakaguchi M, Yoshino A, Itoh N, Meguro A, Mizuki N. Dogs and Humans Share a Common Susceptibility Gene SRBD1 for Glaucoma Risk. *PLoS One.* 2013; 8(9): e74372. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0074372.

Yoshida M, Meguro A, Yoshino A, Nomura N, Okada E, Mizuki N. Association study of IGF1 polymorphisms with susceptibility to high myopia in a Japanese population. *Clin Ophthalmol.* 2013; 7: 2057-2062. 査読有
DOI: 10.2147/OPHTH.S52726.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西出 忠之 (NISHIDE, Tadayuki)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号： 9 0 3 4 7 3 4 4

(2)研究分担者

目黒 明 (MEGURO, Akira)
横浜市立大学・医学研究科・特任講師
研究者番号： 6 0 5 0 8 8 0 2

水木 信久 (MIZUKI, Nobuhisa)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号： 9 0 3 3 6 5 7 9