

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861643

研究課題名(和文)サルコイドーシスの病態形成を規定する遺伝要因の解明

研究課題名(英文) Identification of genes associated with the development of organ lesions in sarcoidosis

研究代表者

澁谷 悦子 (Shibuya, Etsuko)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：70597228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：サルコイドーシスは、全身の諸臓器・組織に、非乾酪性類上皮細胞肉芽腫が形成され、炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患であり、眼、肺、リンパ節、皮膚において高い罹患頻度を示す。また、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、神経系、筋肉、骨、唾液腺、子宮などの臓器にも病変が出現し、長期間にわたり再発と寛解を繰り返すため、サルコイドーシスにより重篤な症状を引き起こしうる。

本研究では、サルコイドーシスの多様な病態および病変形成を規定する遺伝要因をゲノム全域に渡って網羅的な解明を行った。日本人集団を対象としたGWASデータを用いた病変部位ごとの層別化解析により、各病変の形成に関わる遺伝子を病変部位ごとに特定した。

研究成果の概要(英文)：Sarcoidosis is a chronic systemic disease characterized by the accumulation of non-caseating granulomas in a wide range of organs such as lungs, lymph nodes, eye, skin and heart. The etiology of sarcoidosis is still uncertain, but the disease is currently thought to be triggered by various genetic as well as environmental factors.

In this study, we investigated genetic factors associated with each organ lesion in sarcoidosis using a genome-wide association study data in a Japanese population and identified several genes that may contribute to the development of each organ lesion.

研究分野：眼科学

キーワード：サルコイドーシス 遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) サルコイドーシスは、全身の諸臓器・組織に、非乾酪性類上皮細胞肉芽腫が形成され全身の諸臓器に炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患である。サルコイドーシスでは、眼、肺、リンパ節、皮膚において高い罹患頻度を示す。また、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、神経系、筋肉、骨、唾液腺、子宮などの臓器にも病変が出現し、長期間にわたり再発と寛解を繰り返すため、サルコイドーシスにより重篤な症状を引き起こしうる。
- (2) サルコイドーシスの症状・病態は人種および民族的背景で大きく異なる。日本人サルコイドーシス患者における眼病変の頻度は60~80%と欧米の20~40%に比べて高く、ぶどう膜炎の原因疾患として上位を占めており、失明に至るケースもしばしば報告されている。
- (3) また、日本のサルコイドーシス患者では、欧米の患者と比較して、心臓病変を保有する頻度も高値を示し、サルコイドーシス患者において、心臓病変を主因とする死亡の割合が高い。一方、欧米のサルコイドーシス患者では、肺病変を主因とする死亡の割合が高い。眼、肺、心臓、神経系、腎臓などにおける病変発症はサルコイドーシス患者の Quality of Life (生活の質) や予後に大きな影響を与える。
- (4) サルコイドーシスのような多様な病態を示す疾患の有効な診断、治療に当たっては、疾患の病態を解明することが必須であり、病態形成を規定する要因を決定する必要がある。
- (5) しかしながら、サルコイドーシスの病態形成を規定する危険要因(リスクファクター)は未だ明確に決定されておらず、疾患の予防および適切な治療は遅々として進展していない。
- (6) したがって、サルコイドーシスの病態形成を規定する要因を明確に特定し、サルコイドーシスの迅速な診断法および適切な治療法を確立することは大変意義のあることである。
- (7) サルコイドーシスの病態および発症のメカニズムは明確ではないものの、サルコイドーシスは複数の遺伝的要因のもとに、何らかの環境要因が複雑に関与して発症する「多因子性遺伝疾患(multifactorial genetic disease)」と考えられている。
- (8) 私達の研究グループは、サルコイドーシスの遺伝的要因を解明する目的で、以前より、国内の多くの医療施設の協力のもとに収集した日本人サルコイドーシス患者検体および

健康者検体を対象として、Illumina (イリミナ) 社の HumanOmniExpress BeadChip array kit (70 万個以上の SNPs (single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型) を搭載) を用いたゲノム全域を対象とした遺伝子解析(ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)) を行っており、日本人サルコイドーシス患者におけるゲノム全域に渡る遺伝子変異(SNP)情報(GWAS データ)を取得している。

### 2. 研究の目的

- (1) 本研究の目的は、サルコイドーシスの多様な病態および病変形成を規定する遺伝的要因をゲノム全域に渡って網羅的に解明することである。
- (2) また、本研究では、特定した遺伝的要因の情報をもとに、特定した遺伝的要因の介するサルコイドーシスの病態および病変形成のメカニズムを検討する。
- (3) 本研究の成果は、遺伝的要因を対象としたサルコイドーシス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ている。

### 3. 研究の方法

- (1) 日本人サルコイドーシス患者 700 例および日本人健康者 886 例を対象とした GWAS データを活用してサルコイドーシスの各病変部位と相関を示す遺伝子変異を網羅的にスクリーニングする(1 次スクリーニング)。
- (2) 本研究で用いたサルコイドーシス患者検体は「日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会」が示した診断基準に基づいて診断されている。
- (3) 収集している日本人サルコイドーシス患者群では、眼、肺、リンパ節、皮膚、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、神経系、筋肉、骨などの臓器に病変が出現している。したがって、GWAS データを病変部位ごとに着目し、例えば、眼病変を持つサルコイドーシス群と眼病変を持たないサルコイドーシス群に分けたのち、健康者 886 例と比較する(層別化解析)。このように、すべての病変部位ごとに層別化解析を実行し、各々の病変と有意に相関を示す遺伝子変異を網羅的にスクリーニングする。
- (4) また、サルコイドーシスは多因子遺伝性疾患であるため、必ずしも一つの遺伝子変異が単独で特定の病変の形成に関与しているとは言えないため、多変量解析の手法を用いて、サルコイドーシスの各病変の形成に関連する複数の遺伝子変異の組み合わせのスク

リーニングを行う。

(5) 1次スクリーニングが完了したのち、1次スクリーニングにおいて見出されるサルコイドーシスの各病変の形成に関与が示唆される遺伝子変異および遺伝子変異の組み合わせを対象に、1次スクリーニングで用いた日本人集団とは異なる新たな患者・健常者集団を用いて遺伝子解析を実行する(2次スクリーニング:再現性の検討(replication study))。

(6) 2次スクリーニングでは、新たな日本人集団(患者およそ1,000検体および健常者およそ1,000検体)を対象とし、遺伝子変異のジェノタイプングはTaqManアッセイを用いて実行する。TaqManアッセイはApplied Biosystems社のプロトコールに準拠して行う。

(7) 1次スクリーニングと同様に、2次スクリーニングにおいても相関を示す遺伝子変異または遺伝子変異の組み合わせを見出し、各病変の形成に影響を与える遺伝子を特定する。

(8) 2次スクリーニングで特定された遺伝子の領域を対象に、遺伝子内で最も重要に病変の形成に影響を与える遺伝子変異の検索を実行する。すでに得られている遺伝子領域内のSNPsの遺伝子型情報に基づき、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、中国北京の漢民族集団および中国南方の漢民族集団)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。

(9) Imputation解析により見出される、対象領域内においてサルコイドーシスの各病変と最も強固な相関を示すSNPを対象に、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、その相関性を確認・検討する。TaqManアッセイはApplied Biosystems社のプロトコールに準拠して行う。

(10) 特定した遺伝子変異が如何に遺伝子の機能に影響を与えるかを検討する。遺伝子変異はしばしば遺伝子の発現量のコントロールに関与する場合があるため、本解析において、遺伝子変異と遺伝子発現量の関連を調査する。本解析では、リアルタイムRT-PCR法を用いて遺伝子の発現量を定量し、遺伝子変異の有無における遺伝子発現量の比較を実

行する。

#### 4. 研究成果

(1) 日本人集団(サルコイドーシス患者700例、健常者886例)を対象としたGWASデータを用いた病変部位ごとの層別化解析(1次スクリーニング)により、各病変と相関を示す遺伝子変異(SNP)を網羅的にピックアップした。

(2) 1次スクリーニングにおいてピックアップされたSNPを対象に、新たな日本人患者・健常者集団を用いて追認試験を実行し(2次スクリーニング)サルコイドーシスの各病変の形成と有意に相関を示すSNPを絞り込んだ。

(3) さらに、2次スクリーニングにおいて絞り込まれたSNPが位置する遺伝子領域の詳細な解析(Imputation)により、各病変の形成に関わる責任SNPを病変部位ごとに特定した。

(4) Imputation解析により特定した責任SNPを対象に、責任SNPが位置する遺伝子の機能解析を実行した結果、複数の病変において、責任SNPのリスクアレルが遺伝子の発現量の変動に有意な影響を与える可能性を見出した。

(5) 本研究の遺伝学的成果により、サルコイドーシスの病態形成および病変形成のメカニズムの解明が大きく進展することが期待される。また将来的に、遺伝要因を対象としたモノクローナル抗体、標的分子結合ペプチドや酵素阻害剤などのサルコイドーシスの発症・進行予防薬が開発されることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Takase H, Okada AA, Goto H, Mizuki N, Namba K, Ohguro N, Sonoda KH, Tomita M, Keino H, Kezuka T, Kubono R, Mizuuchi K, Shibuya E, Takahashi H, Yanai R, Mochizuki M. Development and validation of new diagnostic criteria for acute retinal necrosis. *Jpn J Ophthalmol.* 2015; 59(1): 14-20. 査読有.  
DOI: 10.1007/s10384-014-0362-0.

Takeuchi M, Kezuka T, Sugita S, Keino H, Namba K, Kaburaki T, Maruyama K, Nakai K, Hijioka K, Shibuya E, Komae K, Hori J, Ohguro N, Sonoda KH, Mizuki N, Okada AA, Ishibashi T, Goto H, Mochizuki M. Evaluation of the long-term efficacy and safety of

infliximab treatment for uveitis in Behçet's disease: a multicenter study. Ophthalmology. 2014; 121(10): 1877-1884. 査読有.  
DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.04.042.

Nishide T, Hayakawa N, Shibuya E, Yagi Y, Mizuki N. Choroidal thickness is affected by many factors which may change the effect of ranibizumab: author's response. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2014; 252(5): 849-850. 査読有.  
DOI: 10.1007/s00417-014-2597-3.

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>.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

澁谷 悦子 ( SHIBUYA, Etsuko )  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号： 7 0 5 9 7 2 2 8

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

水木 信久 ( MIZUKI, Nobuhisa )  
  
目黒 明 ( MEGURO, Akira )  
  
佐藤 摩雪 ( SATO, Mayuki )