

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293077

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた遅発型発達緑内障多発家系におけるエクソーム解析

研究課題名(英文) Whole-exome sequencing in families with late-onset developmental glaucoma

研究代表者

水木 信久 (MIZUKI, Nobuhisa)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90336579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：発達緑内障は隅角の発育異常により眼圧が上昇し、視神経に障害をきたす難治性疾患である。本研究では、遅発型発達緑内障(主に10～20歳代で発症)が多発する複数家系を対象にエクソーム解析を行った。

本研究のエクソーム解析により、遅発型発達緑内障発症の原因となる遺伝子変異を複数同定した。同定した全ての遺伝子変異は位置する遺伝子の機能に重大な影響を与えるものであり、発達緑内障の発症において重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Developmental glaucoma is a type of glaucoma that affects babies and young children. It is caused by congenital morphological abnormalities of the anterior chamber angle. The purpose of this study was to identify causative genes for late-onset developmental glaucoma.

In this study, we identified novel causative genetic variants for late-onset developmental glaucoma by exome analysis in families with the disease. All of these variants had a significant impact on the function of their located genes. Our findings provide new insights into the genetic tendency underlying developmental glaucoma and allow for clearer interpretation of the etiology and pathophysiology of developmental glaucoma at the molecular level.

研究分野：眼科学、分子遺伝学

キーワード：発達緑内障 遺伝子 エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 発達緑内障とは、隅角の先天性な発育異常により眼圧が上昇し、視神経が障害される難治性疾患であり、本邦における発達緑内障の発症頻度は、約3万人に1人と報告されている。

(2) 発達緑内障は、幼児期に発症する早発型発達緑内障(生後1歳までに約80%が発症)、主に10~20歳代に発症する遅発型発達緑内障、他の先天異常(無虹彩症、スタージ・ウェーバー症候群、ペーターズ異常など)を伴う発達緑内障の3つに分類される。

(3) 早発型発達緑内障では、高い眼圧により眼球が拡大するため、流涙、羞明、眼瞼けいれん、角膜混濁、角膜径拡大といった症状が出現する。一方、遅発型発達緑内障では、これら症状の程度が軽いため発症時期が遅れる。また、軽度の症状であるが故に、遅発型は疾患発症の発見が遅れることが多い。他の先天異常を伴う発達緑内障では、全身的な先天異常を伴うことがある。

(4) 発達緑内障は、重篤な視覚障害の原因となる疾患であり、症状に気付かず放置していると視野狭窄が進行し、失明に至ることもある。このような疾患の予防、治療に当たっては、疾患の早期発見が極めて重要であり、疾患の予防および治療に先立った疾患の発症要因の十分な解明が必要とされる。

(5) 発達緑内障では、数世代に渡って血縁者内に複数の発達緑内障発症者を持つ多発家系がしばしば観察されることから、何らかの遺伝的要因が疾患の発症に大きく関与していることが推察される。しかしながら、発達緑内障の発症を左右する遺伝的要因は未だ明確に決定されておらず、疾患の予防および治療は進展していない。したがって、発達緑内障の責任遺伝子を特定し、発達緑内障の迅速な遺伝子診断法および有効な予防・治療法を確立することは、患者やその血縁者、そして私たち医療従事者にとって大変意義のあることである。

2. 研究の目的

(1) 私たちの研究グループは、以前より、研究協力者の井上(オリンピア眼科病院)と共同で、遅発型発達緑内障が高頻度に出現する日本人家系の調査を行っており、現在、複数の遅発型発達緑内障の多発家系を保有している。

(2) 特定の疾患が多発する濃厚家系では、その疾患の成因に特定の遺伝的要因がより大きな役割を担っていると言えるため、本研究では、複数の遅発型発達緑内障の多発家系を対象に、次世代シーケンサーを用いて全遺伝子上のエクソン領域のシーケンシング

(エクソーム解析)を実行し、遅発型発達緑内障の発症を左右する責任遺伝子を特定する。

(3) その後、特定した遺伝情報をもとに、遅発型発達緑内障責任遺伝子の機能解析を実行し、責任遺伝子の介する遅発型発達緑内障の発症メカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、3世代以上に渡って遅発型発達緑内障を多発する大家系および2世代に渡って遅発型発達緑内障の発症が観察される小家系を対象に、エクソーム解析を実行し、遅発型発達緑内障の発症原因となる責任遺伝子変異の特定を行う。

(2) 本研究におけるエクソーム解析の実験では、TruSeq エクソーム濃縮キット(Illumina社)を用いて全遺伝子上のエクソン領域を選択的に抽出し、次世代シーケンサーHiSeq 2000またはHiSeq 2500(Illumina社)を用いて、系統的にシーケンシングを実行する。本実験はIllumina社のプロトコルに準拠して行う。

(3) 本エクソーム解析では、疾患の多発家系の罹患症例のシーケンシングデータを多発家系の非罹患症例のデータと比較するだけでなく、1000人ゲノムプロジェクト(<http://www.1000genomes.org/>)の日本人アリル頻度情報およびHapMapプロジェクト(<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>)の日本人アリル頻度情報と比較することで、疾患責任遺伝子変異の絞り込みを行う(バイオインフォマティクス解析)。

(4) さらに、アミノ酸置換変異、フレームシフト変異などのタンパク質に影響を与える変異とそのアリル頻度情報を総合的に検討し、疾患責任遺伝子変異の特定を行う(バイオインフォマティクス解析)。

4. 研究成果

(1) 3世代以上に渡って遅発型発達緑内障を多発する大家系および2世代に渡って遅発型発達緑内障の発症が観察される複数の小家系を対象にエクソーム解析を実行した結果、遅発型発達緑内障の原因となる責任遺伝子を複数特定した。

(2) 特定した全ての責任遺伝子変異は位置する責任遺伝子の機能に重大な影響を与える変異であり、発達緑内障の発症において極めて重要な役割を担っていることが分かった。

(3) 本研究の成果は、遺伝子診断の基礎となり、遅発型発達緑内障の迅速な遺伝子診断を可能にすることが期待される。

(4) 遅発型発達緑内障では症状を自覚せずに発見される例が多く、視野狭窄が進行し、重度の視力低下をきたしている場合が多い。したがって、遺伝子診断により遅発型発達緑内障の責任遺伝子変異の有無を簡便に判定できれば、疾患の早期発見・早期治療も可能となり、本人に与える医学的価値は大変高いと考えられる。発達緑内障の早期発見・早期予防は疾患の重症化による失明者や重度の視覚障害者を減少させることになり、患者本人の QOL (生活の質) の向上に繋がることが期待される。

(5) また、本研究の成果は、疾患責任遺伝子およびその関連タンパク質を対象とした分子標的薬の開発を可能にし、遅発型発達緑内障の効果的な発症予防および進行予防、ひいては遅発型発達緑内障の根治治療へと繋がる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

Yamazoe K, Meguro A, Takeuchi M, Shibuya E, Ohno S, Mizuki N. Comprehensive analysis of the association between UBAC2 polymorphisms and Behçet's disease in a Japanese population. *Sci Rep* 2017;7(1):742. 査読有 DOI:10.1038/s41598-017-00877-3

Takeuchi M, Mizuki N, Meguro A, Umbrello MJ, Kirino Y, Satorius C, Le J, Blake M, Erer B, Kawagoe T, Ustek D, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, Ozyazgan Y, Sousa I, Davatchi F, Francisco V, Shahram F, Abdollahi BS, Nadji A, Shafiee NM, Ghaderibarmi F, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y, Gadina M, Oliveira SA, Gül A, Kastner DL, Remmers EF. Dense genotyping of immune-related loci implicates host responses to microbial exposure in Behçet's disease susceptibility. *Nat Genet* 2017;49(3):438-443. 査読有 DOI:10.1038/ng.3786

Horie Y, Meguro A, Ohta T, Lee EB, Namba K, Mizuuchi K, Iwata D, Mizuki N, Ota M, Inoko H, Ishida S, Ohno S, Kitaichi N. HLA-B51 Carriers are Susceptible to Ocular Symptoms of Behçet Disease and the Association between the Two Becomes Stronger Towards the East Along the Silk Road: A Literature Survey. *Ocul Immunol Inflamm* 2017;25(1):37-40. 査読有 DOI:10.3109/09273948.2015.1136422

Higashi K, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Kitaichi N, Horie Y, Namba K, Ohno S, Nakao K, Sakamoto T, Sakai T, Tsuneoka H, Keino H, Okada AA, Takeda A, Fukuhara T, Mashimo H, Ohguro N, Oono S, Enaida H, Okinami S, Mizuki N. Investigation of Association between IL10 Gene Polymorphisms and Vogt-Koyanagi-Harada Disease in a Japanese Population. *Ophthalmic Genet* 2017;38(2):187-189. 査読有 DOI:10.3109/13816810.2016.1145698

Okui S, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Okada E, Iijima Y, Mizuki N. Analysis of the association between the LUM rs3759223 variant and high myopia in a Japanese population. *Clin Ophthalmol* 2016;10:2157-2163. 査読有 <https://www.dovepress.com/analysis-of-the-association-between-the-lum-rs3759223-variant-and-high-peer-reviewed-article-OPHTH>

Horie Y, Kitaichi N, Hijioka K, Sonoda KH, Saishin Y, Kezuka T, Goto H, Takeuchi M, Nakamura S, Kimoto T, Shimakawa M, Kita M, Sugita S, Mochizuki M, Hori J, Iwata M, Shoji J, Fukuda M, Kaburaki T, Numaga J, Kawashima H, Fukushima A, Joko T, Takai N, Ozawa Y, Meguro A, Mizuki N, Namba K, Ishida S, Ohno S. Ocular Behçet's disease is less complicated with allergic disorders. A nationwide survey in Japan. *Clin Exp Rheumatol* 2016;34(6 Suppl 102):111-114. 査読有 <http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=10697>

Yoshino A, Polouliakh N, Meguro A, Takeuchi M, Kawagoe T, Mizuki N. Chum salmon egg extracts induce upregulation of collagen type I and exert antioxidative effects on human dermal fibroblast cultures. *Clin Interv Aging* 2016;11:1159-1168. 査読有 DOI:10.2147/CIA.S102092

Levinson RD, Yung M, Meguro A, Ashouri E, Yu F, Mizuki N, Ohno S, Rajalingam R. KIR and HLA Genotypes Implicated in Reduced Killer Lymphocytes Immunity Are Associated with Vogt-Koyanagi-Harada Disease. *PLoS One* 2016;11(8):e0160392. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0160392

Ogasawara M, Meguro A, Sakai T, Mizuki N, Takahashi T, Fujihara K, Tsuneoka H, Shikishima K. Genetic analysis of the aquaporin-4 gene for anti-AQP4 antibody-positive neuromyelitis optica in a Japanese population. *Jpn J Ophthalmol* 2016;60(3):198-205. 査読有
DOI:10.1007/s10384-016-0441-5

Nakamura K, Miyano K, Tsuchida T, Meguro A, Mizuki N. Interleukin-17A gene polymorphism with the susceptibility of intestinal symptoms in patients with Behçet's disease. *J Dermatol* 2016;43(6):708-709. 査読有
DOI:10.1111/1346-8138.13251

Nishisako M, Meguro A, Nomura E, Yamane T, Takeuchi M, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Chin S, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. SLC1A1 Gene Variants and Normal Tension Glaucoma: An Association Study. *Ophthalmic Genet* 2016;37(2):194-200. 査読有
DOI:10.3109/13816810.2015.1028649

Oguchi T, Ota M, Ito T, Hamano H, Arakura N, Katsuyama Y, Meguro A, Kawa S. Correction: Investigation of Susceptibility Genes Triggering Lachrymal/Salivary Gland Lesion Complications in Japanese Patients with Type 1 Autoimmune Pancreatitis. *PLoS One* 2016;11(1):e0146738. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0146738

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/OPHT.S95167

Namba K, Goto H, Kaburaki T, Kitaichi N, Mizuki N, Asukata Y, Fujino Y, Meguro A, Sakamoto S, Shibuya E, Yokoi K, Ohno S. A Major Review: Current Aspects of Ocular Behçet's Disease in Japan. *Ocul Immunol Inflamm* 2015;23(S1):S1-S23. 査読有
DOI:10.3109/09273948.2014.981547

Toyoda H, Miyagawa T, Koike A, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Imai M, Fujimura Y, Tamura Y, Ikegami A, Wada Y, Moriya S, Furuya H, Takeuchi M, Kirino Y, Meguro A, Remmers EF, Kawamura Y, Otowa T, Miyashita A, Kashiwase K, Khor SS, Yamasaki M, Kuwano R, Sasaki T, Ishigooka J, Kuroda K, Kume K, Chiba S, Yamada N, Okawa M, Hirata K, Mizuki N, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K. A polymorphism in CCR1/CCR3 is associated with narcolepsy. *Brain Behav Immun* 2015;49:148-155. 査読有
DOI:10.1016/j.bbi.2015.05.003

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

Carapito R, Shahram F, Michel S, Le Gentil M, Radosavljevic M, Meguro A, Abdollahi BS, Inoko H, Ota M, Davatchi F, Bahram S. On the genetics of the Silk Route: association analysis of HLA, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions with Behçet's disease in an Iranian population. *Immunogenetics* 2015;67(5-6):289-293. 査読有
DOI:10.1007/s00251-015-0841-6

Miyake M, Yamashiro K, Tabara Y, Suda K, Morooka S, Nakanishi H, Khor CC, Chen P, Qiao F, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Gotoh N, Tsujikawa A, Meguro A, Kusuha S, Polasek O, Hayward C, Wright AF, Campbell H, Richardson AJ, Schache M, Takeuchi M, Mackey DA, Hewitt AW, Cuellar G, Shi Y, Huang L, Yang Z, Leung KH, Kao PY, Yap MK, Yip SP, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mizuki N, MacGregor S, Vitart V, Aung T, Saw SM, Tai ES, Wong TY, Cheng CY, Baird PN, Yamada R, Matsuda F; Nagahama Study Group, Yoshimura N. Identification of myopia-associated WNT7B polymorphisms provides insights into the mechanism underlying the development of myopia. *Nat Commun*

2015;6:6689. 査読有
DOI:10.1038/ncomms7689

Bakir-Gungor B, Remmers EF, Meguro A,
Mizuki N, Kastner DL, Gul A, Sezerman
OU. Reply to Stoimenis et al. Eur J Hum
Genet 2015;23(10):1280. 査読有
DOI:10.1038/ejhg.2014.288

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

〔学会発表〕(計 2 件)

Meguro A, Nomura E, Inoue R, Inoue Y,
Mizuki N. Whole-exome sequencing
identifies novel genes for late-onset
developmental glaucoma. ARVO-Asia
2017 (アジア視覚・眼科研究協会会議
2017) オーストラリア・ブリスベン、
2017年2月5日。

目黒 明. 発達緑内障家系を対象とし
たエクソーム解析. 第69回日本臨床眼
科学会、眼科DNAチップ研究会、名古屋
国際会議場(愛知県・名古屋市) 2015
年10月22日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水木 信久 (MIZUKI, Nobuhisa)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 90336579

(2) 研究分担者

野村 英一 (NOMURA, Eiichi)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号: 00347303

目黒 明 (MEGURO, Akira)
横浜市立大学・医学研究科・特任准教授
研究者番号: 60508802

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

井上 立州 (INOUE, Rishu)

南波 玲子 (NANBA, Reiko)

佐藤 摩雪 (SATO, Mayuki)