

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462666

研究課題名(和文) 原発開放隅角緑内障における視野障害パターン別全ゲノム解析

研究課題名(英文) Genome wide association study by visual field defect pattern in primary open angle glaucoma

研究代表者

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

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)：1000Kチップで全ゲノム情報を持つ広義原発開放隅角緑内障1100例に対して視野障害を上方、下方、中心の視野障害型を判別した。判別不能と症例数の少なかった中心型を除外し、両眼の上下の視野障害型が判別出来た症例が635例であった。1) 635例において両眼で視野障害型が異なる場合は下方型として解析、2) 515例で両眼が同じ視野障害型のみ、の2つで視野障害型別に全ゲノム解析を行った。しかしながら視野障害別に有意なバリエーションは同定できなかった。今後はプロスペクティブに初期から中期までの視野障害型の判別を行うことで真の視野障害型に関わるバリエーションの同定が可能と考え、1000例を超える新規症例を蓄積した。

研究成果の概要(英文)：We divided the visual field (VF) pattern (i.e., superior, inferior, and central) of 1,100 primary open-angle glaucoma (POAG) subjects, including normal-tension glaucoma (NTG) subjects, in which we had 100K gene chip variant data. We performed a genome-wide association study (GWAS) of the VF pattern of 635 subjects (331 superior and 304 inferior cases), excluding subjects with an undetectable and central pattern as follows: 1) if the subject had a different VF in both eyes, it was analyzed as inferior (n=635), and 2) if the VF pattern was the same in both eyes (n=515). We could not detect a significant variant associated with VF pattern. In order to detect the correct variants that are associated with the VF pattern, we must collect subjects prospectively with their VF at the early stage, and keep the collect DNA from more than 1000 POAG patients.

研究分野：眼科 緑内障

キーワード：緑内障 視野障害 全ゲノム解析

### 1. 研究開始当初の背景

日本では 40 歳以上で緑内障の有病率が 5% 存在し、広義原発開放隅角緑内障が 3.9% と大半を占める<sup>1)</sup>。我々はこれまでに広義原発開放隅角緑内障を 500K の全ゲノム解析<sup>2)</sup>で 418 例、1000K で 833 例を行い、疾患感受性遺伝子を報告してきた実績がある。2012 年に我々が正常眼圧緑内障の感受性遺伝子と報告した CDKN2B-AS1<sup>3)</sup>は日本人のみならず人種を超えて白人<sup>4-5)</sup>、黒人<sup>6)</sup>にも再現された。さらに我々は京都府立医大緑内障専門外来の臨床データベースを 1996 年から構築し、以後継続して入力を更新しており、現在 15 万件を超える臨床データを保有している。よって各症例がどの病型でどのような視野障害パターンを呈するかの判定が可能である。我々の全ゲノムデータを保有する症例から視野障害パターン別に比較解析することで候補遺伝子バリエーションがまず同定できる。さらに我々は 2005 年から緑内障患者 DNA を収集しており、その保有数は緑内障例で 3000 例を超える。それら検体全例において DNA/RNA/血漿を抽出し、不死化細胞株を樹立している。また 500K/1000K 未解析新規症例としての狭義原発開放隅角緑内障は 300 例、正常眼圧緑内障 500 例保有している。既に 500K/1000K で行った全ゲノム解析症例で視野障害パターンを分け、それぞれのパターンを示す候補遺伝子バリエーションを絞り込むことができる。今後も検体収集を継続し、最終的に新規症例を狭義原発開放隅角緑内障/正常眼圧緑内障各 500 例から最適な症例を選択し、再現性取得実験を行う。広義原発開放隅角緑内障の視野障害パターン別遺伝子バリエーションのみならず、病型サブクラス解析も合わせて行い、病型毎の視野障害パターンを示す遺伝子バリエーションについても検討し、視野障害パターンを予測する遺伝子バリエーションを同定できる。同定したバリエーションを p 値が低いものから組み合わせ、我々が既に開発した緑内障発症リスクの判定に関わるアルゴリズム<sup>7)</sup>を用いて視野障害パターンを予測するプロトタイプ遺伝子診断チップを開発する。

### 文献

1. Iwase A, Suzuki Y, Araie M, et al. Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society. *Ophthalmology*. 2004 Sep;111(9):1641-8
2. Nakano M\*, Ikeda Y\* et al. Three susceptible loci associated with primary open-angle glaucoma identified by genome-wide association study in a Japanese population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 4;106(31):12838-42. doi: 10.1073/pnas.0906397106. (\* equal contribution)

3. Nakano M\*, Ikeda Y\* et al. Common variants in CDKN2B-AS1 associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by genome-wide association studies in Japanese. *PLoS One*. 2012;7(3):e33389. doi: 10.1371/journal.pone.0033389. (\* equal contribution)
4. Burdon KP, Macgregor S et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for open angle glaucoma at TMCO1 and CDKN2B-AS1. *Nat Genet*. 2011 Jun;43(6):574-8. doi: 10.1038/ng.824.
5. Wiggs JL, Yaspan BL, Hauser MA et al. Common variants at 9p21 and 8q22 are associated with increased susceptibility to optic nerve degeneration in glaucoma. *PLoS Genet*. 2012;8(4):e1002654. doi: 10.1371/journal.pgen.1002654. Epub 2012 Apr 26.
6. Cao D, Jiao X, Lin X et al. CDKN2B Polymorphism Is Associated with Primary Open-Angle Glaucoma (POAG) in the Afro-Caribbean Population of Barbados, West Indies. *PLoS One* 7(6):e39278, 2012
7. Tokuda Y, Yagi T, Yoshii K, Ikeda Y, Fuwa M, Ueno M, Nakano M, Omi N, Tanaka M, Mori K, Kageyama M, Nagasaki I, Yagi K, Kinoshita S, Tashiro K. An approach to predict the risk of glaucoma development by integrating different attribute data. *SpringerPlus*, 1: 41, 2012.

### 2. 研究の目的

原発開放隅角緑内障の原因遺伝子は、我々を含め世界各国から報告されているが、視野障害のパターンにかかわる遺伝子報告はない。症例により視野障害が起き始める場所が異なる。視野障害は「上方視野障害型」、「下方視野障害型」、「中心視野障害型」に大別できる。quality of vision (QOV) に影響するのは「中心視野障害型」、次に「下方視野障害型」、最後に「上方視野障害型」が続く。視野障害パターンを発症初期段階から遺伝子判定できれば、患者の治療戦略に反映でき、QOV をよりよく保つことに貢献できる。

### 3. 研究の方法

< 緑内障視野障害パターン解析 > (池田・森・上野・木下が担当)  
既に全ゲノムサンプルは 1200 例を超えているが、その視野障害パターンを同定する。また引き続き再現性取得実験用の症例収集を行い、できれば狭義原発開放隅角緑内障 200

例を追加することにより、サブクラス解析を狭義原発開放隅角緑内障・正常眼圧緑内障ともに多数例で解析が行えるようにする。また視野障害パターン別には中心視野障害パターンが最も症例数が少ないことが予想されるため、視野障害パターンの症例数の偏りができるだけ少なくなるように症例収集を行う。緑内障病型および視野障害パターンの診断には、複数の熟練した緑内障専門医があたる。症例の中には末期のため判定不能例や、片眼ずつ異なった視野障害パターンを示す例が存在するため、解析のための最適な症例を選別する。

<ケース・コントロール相関解析> (田代・中野が担当)

全ゲノム解析から取得したジェノタイプング生データを専用サーバに注入後、視野障害パターンにより各 SNP のジェノタイプの頻度計算を実施する。その後、call rate やマイナーアレル頻度 (minor allele frequency, MAF) の厳格なフィルターを設定し、高品質なデータを抽出する。抽出されたデータについて、ジェノタイプおよびアレル頻度に基づく二乗検定を行い、P 値を算出し、ケース群で有意な SNP を同定する。同定された上位の SNP については、Hardy 法則への適合を検証すると共に、全てのジェノタイプングのクラスター画像をチェックし、クラスター不良のデータは排除する。全てのフィルターをクリアした SNP については、その SNP 周辺の染色体情報 (遺伝子の有無や連鎖不平衡ブロック) を UCSC のゲノムブラウザ (<http://genome.ucsc.edu/>) を用いて解析する。500K および 1000K の結果はメタ解析を行って最終的な候補遺伝子バリエーションを確定する。

<候補遺伝子の再現性取得実験解析> (田代・中野が担当)

視野障害の各パターンに関連するバリエーションの有力候補 (数十~数百程度) について、新規に収集した検体 (目標総検体数: 1000 検体) から解析に最適な症例を選別して再現性を検証する。再現性取得実験から取得した高精度なジェノタイプデータに基づいてカイ二乗検定を行い、再現性の有無を確認する。

#### 4. 研究成果

既にアフィメトリクス 1000K チップの全ゲノム解析のジェノタイプデータを取得している正常眼圧緑内障を含む広義原発開放隅角緑内障の 1100 例に対して、視野障害を上方、下方、中心の視野障害型を判別した。判別不能と症例数の少なかった中心型を除外し、両眼の上下の視野障害型が判別出来た症例が 635 例であった。1) 635 例 (上方視野障害型 331 例、下方視野障害型 304 例、男女比において両眼で視野障害型が異なる場合は下方型として解析、2) 515 例で両眼が同じ視野障害型のみ、の 2 つで視野障害型別に全ゲノム解析を行った。しかしながら視野障

害別に有意なバリエーションは同定できなかった。今後はプロスペクティブに初期から中期までの視野障害型の判別を行うことで真の視野障害型に関わるバリエーションの同定が可能と考え、まだ全ゲノム解析を行っていない症新規症例を、狭義原発開放隅角緑内障 423 例 (男女比 238 : 185、平均年齢 64.9 ± 13.4 歳) 正常眼圧緑内障 929 例 (男女比 323 : 606、平均年齢 61.3 ± 13.9 歳) の DNA を蓄積した。

#### 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 8 件)

1. Mori K, Nakano M, Tokuda Y, Ikeda Y, Ueno M, Sotozono C, Kinoshita S, Tashiro K. Stronger association of CDKN2B-AS1 variants in female normal-tension glaucoma patients in a Japanese population. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 査読有、57: 6416-6417, 2016.
2. Ikeda Y\*<sup>1</sup>, Mori K,\*<sup>2</sup>, K Tada, Ueno M, Kinoshita S, Sotozono C. Comparison study of intraocular pressure reduction efficacy and safety between latanoprost and tafluprost in Japanese with normal-tension glaucoma. Clinical Ophthalmology. 査読有、10 1633-1637, 2016 \*equal contribution
3. 中野正和, 池田陽子. 緑内障セミナー : 落屑症候群 / 落屑緑内障に関連する新規遺伝子. あたらしい眼科, 査読無、32 (8): 1147-1148, 2015
4. 三戸千賀子, 池田陽子, 森和彦, 山田裕美, 津崎さつき, 長谷川志乃, 上野盛夫, 中野正和, 吉井健悟, 木下茂. 原発開放隅角緑内障の全身的危険因子の検討. あたらしい眼科, 査読有、32 (11): 1609. 1613, 2015
5. Nakano M, Okumura N, Nakagawa H, Koizumi N, Ikeda Y, Ueno M, Yoshii K, Adachi H, Aleff RA, Butz ML, Highsmith WE, Tashiro K, Wieben ED, Kinoshita S, Baratz KH. Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy in Japanese. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有、2015 Jul 1;56(8):4865-4869. doi:10.1167/iovs.15-17082
6. Aung T, Ozaki M, Mizoguchi T, Allingham RR, Li Z, Haripriya A, Nakano S, Uebe S, Harder JM, Chan AS, Lee MC, Burdon KP, Astakhov YS, Abu-Amero KK, Zenteno JC, Nilgün Y, Zarnowski T, Pakravan M, Safieh LA, Jia L, Wang YX, Williams S, Paoli D,

- Schlottmann PG, Huang L, Sim KS, Foo JN, Nakano M, Ikeda Y, Kumar RS, Ueno M, Manabe SI, Hayashi K, Kazama S, Ideta R, Mori Y, Miyata K, Sugiyama K, Higashide T, Chihara E, Inoue K, Ishiko S, Yoshida A, Yanagi M, Kiuchi Y, Aihara M, Ohashi T, Sakurai T, Sugimoto T, Chuman H, Matsuda F, Yamashiro K, Gotoh N, Miyake M, Astakhov SY, Osman EA, Al-Obeidan SA, Owaidhah O, Al-Jasim L, Shahwan SA, Fogarty RA, Leo P, Yetkin Y, Oğuz Ç, Kanavi MR, Beni AN, Yazdani S, Akopov EL, Toh KY, Howell GR, Orr AC, Goh Y, Meah WY, Peh SQ, Kosior-Jarecka E, Lukasik U, Krumbiegel M, Vithana EN, Wong TY, Liu Y, Koch AE, Challa P, Rautenbach RM, Mackey DA, Hewitt AW, Mitchell P, Wang JJ, Ziskind A, Carmichael T, Ramakrishnan R, Narendran K, Venkatesh R, Vijayan S, Zhao P, Chen X, Guadarrama-Vallejo D, Cheng CY, Perera SA, Husain R, Ho SL, Welge-Luessen UC, Mardin C, Schloetzer-Schrehardt U, Hillmer AM, Herms S, Moebus S, Nöthen MM, Weisschuh N, Shetty R, Ghosh A, Teo YY, Brown MA, Lischinsky I; Blue Mountains Eye Study GWAS Team; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Crowston JG, Coote M, Zhao B, Sang J, Zhang N, You Q, Vysochinskaya V, Founti P, Chatzikiyriakidou A, Lambropoulos A, Anastasopoulos E, Coleman AL, Wilson MR, Rhee DJ, Kang JH, May-Bolchakova I, Heegaard S, Mori K, Alward WL, Jonas JB, Xu L, Liebmann JM, Chowbay B, Schaeffeler E, Schwab M, Lerner F, Wang N, Yang Z, Frezzotti P, Kinoshita S, Fingert JH, Inatani M, Tashiro K, Reis A, Edward DP, Pasquale LR, Kubota T, Wiggs JL, Pasutto F, Topouzis F, Dubina M, Craig JE, Yoshimura N, Sundaresan P, John SW, Ritch R, Hauser MA, Khor CC. A common variant mapping to CACNA1A is associated with susceptibility to exfoliation syndrome. Nat Genet. 査読有、2015 Feb 23. doi: 10.1038/ng.3226.
7. Nakano M\*, Ikeda Y\*, Tokuda Y\*, Fuwa M, Ueno M, Imai K, Sato R, Omi N, Adachi H, Kageyama M, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K. Novel common variants and susceptible haplotype for exfoliation glaucoma specific to Asian population. Sci Rep. 査読有、2014 Jun 18;4:5340.doi:10.1038/srep05340.\*equal contribution
8. 中野正和、池田陽子、徳田雄市、不破正博、森 和彦、上野盛夫、今井浩二郎、佐藤隆一、大見奈津江、足立博子、景山正明、森和彦、田代 啓、木下 茂. 落屑緑内障におけるアジア人固有の新規バリエーション/ハプロタイプの同定. 日本眼科学会雑誌、査読無、118(10):867, 2014
- 〔学会発表〕(計 9 件)
1. Ikeda Y, Mori K, Yoshikawa H, Yoshii K, Ueno M, Imai K, Maruyama Y, Kinoshita S, Sotozono C. Evaluation of the Safety and Efficacy of ROCK inhibitor Ripasudil Hydrochloride Hydrate for the Reduction of Intraocular Pressure. Chicago 2016 American Academy of Ophthalmology(AAO), IL, USA, 2016.10.15-18
2. Nakano M, Adachi H, Tokuda Y, Nakagawa H, Ikeda Y, Ueno M, Sotozono C, Kinoshita S, Tashiro K. Genome-wide association study of Fuchs endothelial corneal dystrophy in a Japanese population. 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2016.10.18-22. Vancouver, Canada
3. Ikeda Y, Nakano M, Mori K, Ueno M, Imai K, Tokuda Y, Adachi H, Sato R, Omi N, Tashiro K, Kinoshita S. NOVEL VARIANTS ASSOCIATED WITH EXFOLIATION SYNDROME/EXFOLIATION GLAUCOMA IN JAPANESE 6th World Glaucoma Congress 2015.6.6-9 HongKong, China
4. Ikeda Y, Nakano M, Mori K, Ueno M, Imai K, Omi N, Y Tokuda Y, Adachi H, Tashiro K, Kinoshita S. New susceptible genetic variants of exfoliation syndrome/exfoliation glaucoma in a Japanese population. 2015.5.5, Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology(ARVO). Denver, USA
5. 池田陽子、森 和彦、佐藤隆一、佐藤史子、吉井健悟、上野盛夫、今井浩二郎、吉川晴菜、丸山悠子、田代 啓、木下茂. 原発開放隅角緑内障における線維柱帯切除後 4 年間の眼圧季節変動の検討. 第 69 回日本臨床眼科学会 2015.10.22-25, 名古屋(名古屋国際会議場)
6. 池田陽子. 国際コンソーシアム共同研

究で得られた広義原発開放隅角緑内障に関連するバリエーションDNAチップ研究会. 第69回日本臨床眼科学会2015.10.22-25, 名古屋(名古屋国際会議場)

7. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Nakano M, Tokuda Y, Omi N, Sato R, Yoshii K, Tashiro K, Kinoshita S. Association Analysis between CDKN2B-AS1 Genotype and Quantitative Traits of Primary Open-Angle Glaucoma. 11th European Glaucoma Congress (EGS), Nice, France, 2014.6.7-11
8. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Nakano M, Tokuda Y, Omi N, Sato R, Yoshii K, Tashiro K, Kinoshita S. Association Analysis between CDKN2B-AS1 Genotype and Quantitative Traits of Primary Open-Angle Glaucoma. ARVO, Orland, USA, 2014.5.6
9. 上野盛夫、池田陽子、森和彦、中野正和、大見奈津江、佐藤隆一、佐藤史子、吉井健悟、田代啓、木下茂. CDKN2B-AS1 ジェノタイプと原発開放隅角緑内障の量的形質との関連解析. 第25回日本緑内障学会 2014.9.19-21 大阪(大阪国際会議場)

〔図書〕(計 1 件)

池田陽子、中野正和. 緑内障診療クローズアップ. 緑内障診療の基本. 緑内障に関連する遺伝子. p6 - 11. メジカルビュー. 東京. 2014

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

池田 陽子 ( IKEDA, Yoko )

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師  
研究者番号：00433243

##### (2)研究分担者

田代 啓 ( TASHIRO, Kei )

京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10263097

木下 茂 ( KINOSHITA, Shigeru )

京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：30116024

森 和彦 ( MORI, Kazuhiko )

京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：40252001

上野 盛夫 ( UENO, Morio )

京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：40426531

中野 正和 ( NAKANO, Masakazu )

京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：70381944

##### (3)連携研究者 なし

#### (4)研究協力者

吉川晴菜 ( YOSHIKAWA, Haruna )

京都府立医科大学・医学研究科・研修員  
研究者番号：80516013

吉井健悟 ( YOSHII, Kengo )

京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：90388471

佐藤隆一 ( SATO, Ryuichi )

京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：30717533

大見奈津江 ( OMI, Natsue )

京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：10438210

佐藤史子 ( SATO, Fumiko )

京都府立医科大学・医学研究科・研修員