

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860226

研究課題名(和文) Imputation法を利用したサルコイドーシスのゲノムワイド関連解析

研究課題名(英文) Imputation-based genome-wide association study of sarcoidosis

## 研究代表者

目黒 明 (MEGURO, Akira)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：60508802

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に炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患である。本研究では、サルコイドーシスの新規の疾患感受性遺伝子を同定するため、日本人集団を対象に、Imputation法を用いたサルコイドーシスのゲノムワイド関連解析を実行した。その後、新たな日本人集団およびチェコ人集団を用いて追認試験(再現性の検討)を実行し、人種を超えてサルコイドーシスと関連を示す新規の疾患感受性遺伝子を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：Sarcoidosis is a chronic multi-systemic inflammatory disorder. In this study, to identify new susceptibility genes of sarcoidosis, we performed an imputation-based genome-wide association study (GWAS) of sarcoidosis using a Japanese population. After the imputed GWAS stage, we performed a replication study using independent Japanese and Czech populations. This study found some new susceptibility genes of sarcoidosis.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：サルコイドーシス 遺伝子 GWAS imputation

### 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に炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患であり、長期間にわたり再発と寛解を繰り返すため、本病により重度な視力障害を来す患者は多く、最悪の場合、失明に至ることもある難病である。また、本邦のサルコイドーシス患者では、欧米と比較して心臓病変の頻度は高値を示し、心臓病変を主因とする死亡の割合が高い。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・早期治療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。

(2) しかしながら、多因子遺伝性疾患であると考えられるサルコイドーシスの発症を左右する遺伝因子(疾患感受性遺伝子)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。

(3) したがって、サルコイドーシスの疾患感受性遺伝子を同定し、サルコイドーシスの迅速な遺伝子診断法を確立することは、患者本人にとっても私たち医療従事者にとっても大変意義のあることである。

(4) ゲノム全域を対象に遺伝子解析を実行する GWAS (genome-wide association study: ゲノムワイド関連解析) は、ゲノムワイドに遺伝子スクリーニングを実行するため、疾患の遺伝的要因の解明に大きな力を発揮する。近年、海外の人種集団を対象としたサルコイドーシスの GWAS が多く実施されており、サルコイドーシスの発症に関わる疾患感受性遺伝子が複数報告されている。しかしながら、サルコイドーシス発症との相関性は、いずれの遺伝子においても依然として検証の余地を残しており、今後のさらなる研究が必要とされている。

(5) 私たちのグループは、長年にわたり、国内外の多くの医師や研究者とサルコイドーシスの病態解明の共同研究を続けており、日本人のサルコイドーシス患者を 1,600 検体以上収集している。

(6) 私たちは、すでに日本人集団(サルコイドーシス患者 700 検体、健常者 900 検体)を対象とした Illumina 社の HumanOmni Express BeadChip Kit (約 73 万個の SNPs (single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型))を用いた GWAS を完了している。さらに、新たな日本人集団(サルコイドーシス患者 900 検体、健常者 1,000 検体)およびチェコ人集団(サルコイドーシス患者 271 検体、健常者 264 検体)を用いて、GWAS で得られた結果の追認試験(再現性の検討)を行った結果、人種を超えてサルコイドーシスと顕著に相関する新規の疾患感受性遺伝子を同定

している(論文投稿中)。

(7) しかしながら、依然として未同定のサルコイドーシス感受性遺伝子が多く存在していると推測されている。

(8) したがって、サルコイドーシスの発症に関与する遺伝子を網羅的に特定することは極めて重要であり、サルコイドーシスの迅速な診断および適切な治療法の確立に繋がることが期待される。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、すでに取得している日本人集団の GWAS データ(論文投稿中)を対象に Imputation 解析を実行し、ゲノム全域のより詳細で高密度な遺伝子変異情報を取得して、前述の GWAS 研究では同定できなかったサルコイドーシスの疾患感受性遺伝子を網羅的に特定する。Imputation 解析は、連鎖不平衡ブロックにおける SNP 間の連鎖を利用することにより、未判定であった SNP のデータの推測を行うものであり、通常の GWAS では見出すことのできなかった遺伝的要因の検出に大きな力を発揮する。近年、GWAS データを対象にした Imputation 解析が積極的に実施されており、多くの疾患において、新たな疾患感受性遺伝子の同定が行われている。

(2) その後、特定した遺伝情報をもとに、サルコイドーシスの発症メカニズムの解明を行う。

(3) 本研究で得られる遺伝情報は、サルコイドーシス感受性遺伝子(分子)の機能を抑制する分子標的薬の開発に繋がり、その臨床的意義は極めて大きい。

### 3. 研究の方法

(1) 前述の通り、私たちはすでに日本人集団を対象としたサルコイドーシスの GWAS データを取得し、人種を超えてサルコイドーシスと顕著に相関する疾患感受性遺伝子を複数同定している。本研究では、日本人集団の GWAS データを対象に Imputation 解析を実行して、ゲノム全域のより詳細で高密度な SNP 情報を取得する。Imputation 解析の手順を以下に記す。

日本人集団(サルコイドーシス患者 700 検体、健常者 900 検体)の GWAS データ(約 73 万個の SNPs の遺伝子型情報)を対象に、MACH ソフトウェア(ミシガン大学、<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/MACH/index.html>)を用いて Imputation 解析を実行する。Imputation 解析のリファレンスパネルとして、1000 人ゲノムプロジェクト(1000 Genomes Project、<http://www.1000genomes.org/>)の東アジア人集団の遺伝子型データを使

用する。

Imputation 解析により取得したゲノム全領域を高密度に網羅する SNP (Imputed SNP) について、Imputation の精度 (正確性)・質の評価 (Quality control) を行う。「 $Rsq < 0.30$ 、マイナーアリル頻度  $< 0.01$ 、ハーディー・ワインベルグ平衡  $P$  値  $< 0.000001$ 」を示す信頼度の低い Imputed SNP を除外する。

の Quality control をクリアする Imputed SNP を対象に、サルコイドーシス患者・健常者間でアリル頻度および遺伝子型頻度の比較 (相関解析) を行い、サルコイドーシス患者・健常者間で有意な頻度差を示す SNP を網羅的にスクリーニングする。

(2) Imputation 解析で得られた結果を評価するため、網羅的にスクリーニングされた候補 SNP を対象に、新たな日本人集団 (サルコイドーシス患者 1,200 検体、健常者 1,200 検体) およびチェコ人集団 (サルコイドーシス患者 350 検体、健常者 350 検体) を用いて相関解析 (再現性の検討: Replication study) を実行し、サルコイドーシスと真に相関する SNP を特定する。再現性の検討における SNP の遺伝子解析は、TaqMan アッセイを用いて実行する。TaqMan アッセイは Life Technologies 社のプロトコルを準拠して行う。

(3) 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。得られた個人情報に連結匿名化の上、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。

(4) 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) 日本人の GWAS 集団 (サルコイドーシス患者 700 検体、健常者 900 検体) を対象とした Imputation 解析により、Quality control をクリアするゲノム全領域を高密度に網羅する約 800 万個の Imputed SNPs の遺伝子型データを取得した。

(2) (1) で取得した約 800 万個の Imputed SNPs について、日本人の GWAS 集団 (サルコイドーシス患者 700 検体、健常者 900 検体) を用いて患者・健常者間の相関解析を実行し、サルコイドーシスとゲノムワイドな有意レベル ( $P < 5.0 \times 10^{-8}$ 、genome-wide

significant level) で相関を示す SNP を網羅的に検出した。

(3) 同定した SNP を対象に、新たな日本人集団 (サルコイドーシス患者 1,200 検体、健常者 1,200 検体) およびチェコ人集団 (サルコイドーシス患者 350 検体、健常者 350 検体) を用いて相関解析 (再現性の検討) を実行し、人種を超えてサルコイドーシスの発症リスクと真に相関を示す新規の遺伝子領域を複数同定した。

(4) 本研究で同定された遺伝情報は、サルコイドーシスの発症メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。さらに、同定された遺伝情報は、サルコイドーシスの新たな治療薬の開発にも繋が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 11 件)

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/OPHTH.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, Kusuhashi 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. 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1件)

Meguro A, Ishihara M, Yamane T, Mizuki N. Screening of susceptibility loci for ocular sarcoidosis using a genome-wide association study: preliminary report. World Ophthalmology Congress 2016(国際眼科学会 2016) 2016年2月6日-9日、メキシコ・グアダハラ。

〔図書〕(計2件)

目黒 明、水木信久、先端医学社、Retina Medicine(ぶどう膜炎(ペーチェット病、サルコイドーシス、原田病)) 2014;3(1):38-43.

目黒 明、木村育子、金原出版、眼科(ぶどう膜炎と遺伝的背景) 2014;56(2):258-265.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(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)

大野 重昭 (OHNO, Shigeaki)

Martin Petrek (PETREK, Martin)

Dan Kastner (KASTNER, Dan)

南波 玲子 (NANBA, Reiko)

佐藤 摩雪 (SATO, Mayuki)