

力除く<sup>8,9</sup>

⑤ MinElute PCR Purification Kitのプロトコールに従い、PCR産物を精製する。最終的に11  $\mu$ LのElution BufferでPCR産物を溶出する

⑥ 溶出液1  $\mu$ Lを用いて、Bioanalyzer 2100で収量、サイズ、精製度を解析する

## 6 大規模シーケンサー用ライブラリの調製とシーケンス (図1 B①)

ステップ5のPCR産物に問題がなければ、大規模シーケンサー用のライブラリ調製へ移行する(プロトコールについては各機器のマニュアルを参照されたい)。

## 実験例

われわれは本法を用いて47遺伝子の435エクソン(計457 PCR産物、全長約172 kb)をヒトゲノムから濃縮し、Genome Analyzer II(イルミナ社)を用いてシーケンスデータを取得した<sup>8)</sup>。その際、人種差を検討するためにCEU(ヨーロッパ系)とYRI(アフリカ系)のHapMap DNAをゲノムDNAとして用いた。また、PCR産物のサイズ(120~957 bp、平均長400 bp)やGC含有率(24~78%)に偏りのないようにプライマーを設計した。さらに、相同性の高い遺伝子群のシーケンス精度を検証するためにイオンチャンネル系の遺伝子ファミリーを、SNPのジェノタイプ精度を検証するためにあらかじめシーケンスされているENCODE領域由来のエクソン配列を標的に含めた。

以上のように取得したデータを1ウェルごとに標的を濃縮する通常のPCRで取得したデータと定量的に比較したところ、両方法ともに約84%のシーケンスデータが再現性高く標的配列上にアラインされ、全データの90%以上が5倍以内のカバー率に収まった<sup>8)</sup>。また、捕獲できた標的配列上のSNPの決定精度は99%以上であり、人種差や標的の配列特性によるデータ精度への顕著な影響は認められなかった。特筆すべきことに、PCRで問題視されるallelic imbalanceによる

SNPのタイピングエラーは~0.1%程度とごくわずかであった。さらに、本法を3,976 PCR産物(全長約1.5 Mb)にスケールアップしたところ、457 PCR産物のときと遜色のない高い濃縮効率とデータ精度が得られた。したがって本法は、標的配列に対して特異性の高いプライマーを設計することができれば、ゲノム上の領域や構成成分等の配列の違いによらずに一度に多数の標的配列を均一に濃縮することが可能であり、取得されるデータも高精度であることが示された。

## おわりに

大規模シーケンサーの1ランあたりの取得可能なデータ量は各機種によって規定されているので、研究者はシーケンスしたい①領域のサイズ、②検体数、③カバー率の3つの条件を考慮して研究を設計する必要がある。このうちの③については、シーケンスデータの精度として1塩基を正確に読むのに最低20×のカバー率が要求されるため、①と②の変数について研究目的に合致した最適な標的配列濃縮法を選択する。本法は、マイクロ流路系を活用することによって一度に多数の標的の濃縮を可能にしたと同時に、エマルジョンPCRにおける液滴の体積が揃うことによって標的ごとの増幅効率の差がほとんどなく、取得できるシーク

エンスデータのカバー率の差が最小限に抑えられる点で有用性が高い。一方われわれはハイブリダイゼーションに基づく標的配列濃縮法の開発研究にも携わり<sup>6)</sup>、Mbにわたる領域のシークエンスデータを多検体分取得するようなハイスループットデータが要求される場合にはその威力を発揮することを体験している。しかし、配列によってそもそも捕獲できない標的が存在することや標的配列ごとに濃縮されるカバー率に依然大差が生じることから今後のさらなる改良が待たれるところである。

奇しくもわれわれが緑内障のGWASで同定した3カ所の領域のいずれもが遺伝子砂漠領域であった<sup>2)</sup>。今後GWASで同定された多数の疾患関連領域について、適切な標的配列濃縮法を採用して高精度なシークエンスデータを取得することで、遺伝子砂漠領域が数々の疾患にもたらす生化学的意義の全容が解明されていくことが期待される。

#### 謝辞

本稿で紹介した研究成果はKelly A. Frazer博士（現 Moores UCSD Cancer Center, University of California, San Diego）のご指導の下、SGM (Scripps Genomic Medicine), The Scripps Research Instituteで実施されました。

本稿の執筆にあたりご助言いただきましたKelly A. Frazer博士、SGMのメンバーおよびDarren R. Link博士 (RainDance Technologies, Inc.) に感謝申し上げます。

#### 文献

- 1) Frazer, K. A. et al. : Nature Rev. Genet., 10 : 241-251, 2009
- 2) Nakano, M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 : 12838-12842, 2009
- 3) Manolio, T. A. et al. : Nature, 461 : 747-753, 2009
- 4) Hodges, E. et al. : Nature Genet., 39 : 1522-1527, 2007
- 5) Gnirke, A. et al. : Nature Biotech., 27 : 182-189, 2009
- 6) Tewhey, R., Nakano, M. et al. : Genome Biol., 10 : R116, 2009
- 7) Porreca, G. J. et al. : Nature Methods, 4 : 931-936, 2007
- 8) Tewhey, R. et al. : Nature Biotech., 27 : 1025-1031, 2009

#### ● 筆頭著者プロフィール ●

中野正和：2002年3月、東京理科大学大学院基礎工学研究科生物学専攻博士後期課程修了(工博)。'02年4月、日本学術振興会PD特別研究員(東京大学医科学研究所遺伝子解析施設 斎藤 泉教授)。'04年5月、現所属助手。'07年4月、助教。'08年4月、Scripps Genomic Medicine, The Scripps Research Institute。'09年8月、Moores UCSD Cancer CenterのKelly A. Frazer博士の下で大規模シークエンス技術を修得。'10年4月、学内講師として帰学。GWASで同定された疾患関連領域の生化学的意義をこれまでに培った分子生物学的手法を駆使して解明していきたい。

Book Information

# 目的別で選べる PCR実験プロトコール

失敗しないための実験操作と条件設定のコツ


編著／佐々木博己 著／青柳一彦, 河府和義

近刊

目的別で選べる  
シリーズ第2弾  
12月上旬発行予定

シリーズ好評既刊

目的別  
タンパク質発現  
プロトコール



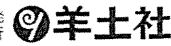
目的別で選べる タンパク質発現プロトコール

編／永田恭介, 奥脇暢

• 定価(本体4,200円+税) • 2色刷り B5判 268頁  
• ISBN978-4-7581-0175-2

• 予価(本体4,500円+税)  
• 2色刷り B5判 約200頁  
• ISBN978-4-7581-0178-3

発行



### 3. 遺伝子診断

— Genetic diagnosis of glaucoma —

池田陽子\* 中野正和\*\* 田代啓\*\*  
森和彦\* 木下茂\*

#### はじめに

緑内障には家族歴があることが臨床で知られていた。家系調査から莫大な時間と手間をかけた緑内障との関連が判明したのが *Myocilin*<sup>1)</sup>, *Optineurin*<sup>2)</sup>, *WDR36*<sup>3)</sup> などの遺伝子である<sup>4)</sup>。並行して候補遺伝子関連解析も行われたので、これらの時代を第1期：家系調査/候補遺伝子解析期(図1)とすると、家系に頼らずゲノムワイドDNAマイクロアレイ<sup>註1)</sup>(以下、アレイ)を用いた全ゲノム関連解析による落屑緑内障の *LOXLI* 同定<sup>5)</sup>以降の時代を第2期：ゲノムワイド関連解析期(図1)と呼ぶのがふさわしい。ゲノム研究の急発展の前提となる重大なプロジェクトとして、ヒトゲノム上の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP; “スニップ”と発音する)をすべて列挙しようとする国際HapMapプロジェクト<sup>6)</sup>が大きな役割を果たした。このおかげで遺伝子解析の技術革新と解析費用の価格崩壊が起こり、急発展した。ア

レイ技術の進歩のテンポは早く、2005年の加齢黄斑変性の100Kアレイから始まって、2007年の *LOXLI* の報告には300Kアレイ、2009年の筆者らによる広義の原発開放隅角緑内障の報告<sup>7)</sup>には500Kアレイが使用され、現在は1000Kアレイ実験が進行中である。それと時期的に重複しながら独自の役割をカバーする第3期：次世代(第二世代)シーケンス期(図1)が誕生しようとしている。第二世代シーケンサー<sup>註2)</sup>は短時間で広範なゲノム領域を一挙に塩基配列決定する機器である。眼科領域においても今後は660Kアレイや1000Kアレイのゲノムワイド関連解析報告のみならず、第二世代シーケンサーを用いた報告が数多く発表されると予想される。これらの背景を受け、緑内障の遺伝子診断を目指す研究は急速に進歩している。本稿では、遺伝子診断を目指す研究のこれまで(過去)、今(現在)、これから(未来)について概説する。

#### 1. これまでの遺伝子診断を目指す研究

疾患に関連するゲノム領域を同定する方法として古典的手法に分類される連鎖解析は、そもそも単一遺伝子上の変異に起因するメンデル遺伝病の責任遺伝子を同定するために有効な遺伝学的解析法である。連鎖解析では、疾患に罹患

\* Yoko IKEDA, Kazuhiko MORI, Shigeru KINOSHITA 京都府立医科大学大学院医学研究科視覚機能再生外科学

\*\* Masakazu NAKANO, Kei TASHIRO 京都府立医科大学大学院医学研究科ゲノム医科学

Key words: バリエント, マイクロアレイ, 次世代シーケンサー, SNP, GWAS, POAG

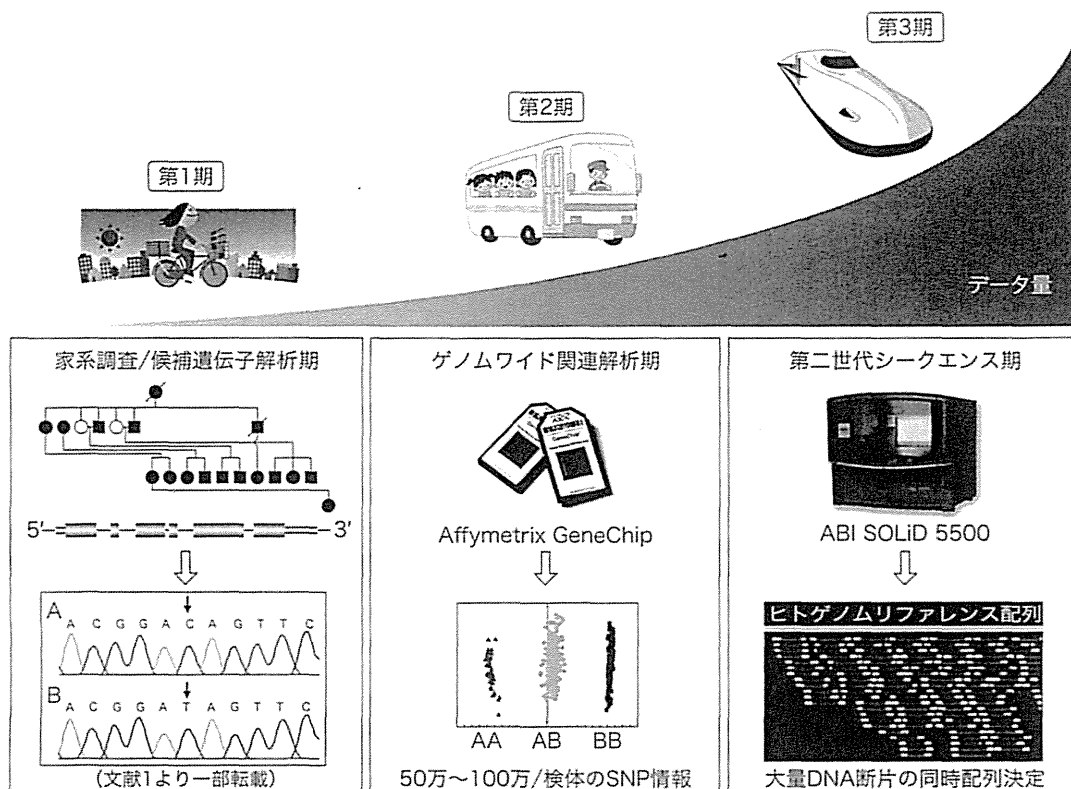


図1 緑内障遺伝子診断を目指す研究の変遷

遺伝子診断の基礎となる有用なバリエーションを同定する技術はここ数年間で急速に発展している。第1期である家系調査/候補遺伝子解析期に比べて、第2期のゲノムワイド関連解析期では取得できる塩基配列情報の量が、第3期の第二世代シーケンス期では取得できる塩基配列情報の量と質が劇的に進歩している。ただし、それぞれの方法には捨てがたい特長があるので、これらは共存し続ける。

している血縁者を多く含む何世代にもわたる大家系サンプルを用いて、ゲノム上に高度に保存されている繰り返し配列などを位置の目印(マーカー)に疾患と連鎖して代々受け継がれているゲノム領域を特定していく。その後、特定された領域に存在する複数の遺伝子と疾患との関係を精査していき、時として責任遺伝子に辿り着くこともある。緑内障においても、家系を用いた連鎖解析によって、若年性の開放隅角緑内障(juvenile open angle glaucoma: JOAG)に関連する領域としてヒト1番染色体上の1q21-1q31領域が1993年に初めて報告された<sup>8)</sup>。さらに連鎖解析は、糖尿病や高血圧症に代表される“common disease(ありふれた疾

患)”(生活習慣病や成人病と訳されることもある。また、しばしば多因子疾患とも呼ばれる)に関連するゲノム領域を探索する手段としても応用されている。多治見スタディ<sup>9)</sup>によって本邦の40歳以上の有病率が約3.9%であることが判明してありふれた疾患の代表格のひとつとして考えられている広義の原発開放隅角緑内障(primary open angle glaucoma: POAG)についても連鎖解析が実施されてきた。その結果、1990年代後半から現在までにPOAGに関連する14カ所におよぶゲノム領域(GLC1A-GLC1N)が同定され(表1)、その内の3領域からはミオシリン遺伝子(MYOC)<sup>1)</sup>、オプチニューリン遺伝子(OPTN)<sup>2)</sup>、WD repeat do-

表1 連鎖解析によって同定された緑内障関連ゲノム領域\*

同定された年	領域名**	染色体位置	遺伝子	病型
1993	GLC1A	1q23-1q24	MYOC	JOAG, POAG
1996	GLC1B	2cen-2q13	-	POAG
1997	GLC1C	3q21-3q24	-	POAG
1998	GLC1D	8p23	-	POAG
1998	GLC1E	10p13-10p15	OPTN	POAG, NTG
1999	GLC1F	7q35-7q36	-	POAG
2003	GLC1G	5q22.1	WDR36	POAG, NTG
2000	GLC1H	2p16.3-2p15	-	POAG
2005	GLC1I	15q11-15q13	-	POAG
2004	GLC1J	9p22	-	JOAG
2004	GLC1K	20p12	-	JOAG
2005	GLC1L	3p22-3p21	-	POAG
2006	GLC1M	5q22.1-5q32	-	JOAG
2004	GLC1N	15q22-15q24	-	JOAG

\* The Glaucoma Book : A Practical, Evidence-Based Approach to Patient Care. Paul N. Schacknow, John R. Samples 編, Springer, 2010 から一部転載。

\*\*命名法: GLC, glaucoma; 1, 開放隅角緑内障; A-N, 同定されたアルファベット順(一部前後している)。

JOAG : juvenile open angle glaucoma, POAG : primary open angle glaucoma

main 36 遺伝子 (*WDR36*)<sup>3)</sup> が緑内障関連遺伝子として報告されている。しかしいずれの報告も、多数の遺伝因子と環境因子とが複雑に作用しあって発症する多因子疾患である POAG を解析対象としながら、一般集団における有病率よりも高く、かつ一部 JOAG 症例も含まれている可能性のあるバイアスのかかった大家系を用いて単一遺伝子の同定に至っていることから、これらの結果を直ちに一般集団における POAG の遺伝子診断には利用できない。現に *MYOC*, *OPTN*, *WDR36* 上のバリエーション<sup>注3)</sup> は、POAG 全患者の数%でしか検出できていない<sup>4)</sup>。また、連鎖解析により同定された遺伝子上のバリエーションは比較的最近(数世代前)に何らかの要因で生じた変異<sup>注3)</sup> がその家系特有に継承されてきた可能性も否定できない。したがって、これまでの連鎖解析によって同定されたバリエーションはごく一部の POAG 患者にとっては有用な情報であるものの、現時点では残念ながら一般の緑内障遺伝子診断の基盤情報になった例はない。

一方、連鎖解析とは対象とする母集団と解析

方法が異なる遺伝学的解析法として、一般集団から表現型の異なる2つのグループを準備してグループ間で有意差のあるバリエーションを検出するケース・コントロール関連解析(相関解析)がある。相関解析には、全ゲノムを客観的に調べるゲノムワイド関連解析法と、文献的知識から候補遺伝子を絞って調べる候補遺伝子解析法がある。アレイを用いた網羅的な解析技術が登場してゲノムワイド関連解析が可能になるまでは、眼科的臨床所見または基礎研究の成果から緑内障の病態との関係が推測されるさまざまな遺伝子(候補遺伝子)の蛋白質に翻訳される領域(コーディングエクソン、以下、単にエクソンと略す)上の塩基配列をサンガー法によるダイレクトシーケンシング<sup>注4)</sup>などによって決定し、その配列データを用いた相関解析が精力的に実施された<sup>4)</sup>。たとえば、緑内障の最終的な臨床病態として網膜神経節細胞が選択的に障害されることが判明している<sup>10)</sup>ことから、中枢神経系のアルツハイマー病にも関与している apolipoprotein E 遺伝子(*APOE*)やアポトーシスを引き起こす p53 遺伝子(*TP53*)などが解析された。

また、前房水の排出障害による眼圧の上昇が緑内障の最大のリスク因子である<sup>10)</sup>ことから、線維柱帯における細胞接着因子であるカドヘリン遺伝子(*CDH-1*)なども解析された。他にも、主要なシグナル伝達系や免疫系の遺伝子など解析対象は多岐にわたっている。しかし、これまでの候補遺伝子の関連解析研究例では、統計学的な検出力が十分な大規模集団での検討が見受けられないので、遺伝子診断に結びつく再現性の高い知見が得られていない。緑内障のマーカー候補 SNP が他の多因子疾患と同様に 1.2 から 1.5 程度の危険度しかないことが判明しつつあり、その危険度のマーカー SNP を検出する統計学的検出力を確保するためには、少なくともケース 500 例対コントロール 500 例、できれば 1,000 例ずつ以上の症例数が必要である。これまでに発表されたほぼすべての緑内障候補遺伝子研究は、小規模な症例数で実施されたために検出力不足であり、おそらく大規模研究では再現困難であることが惜まれる。検出力不足に陥った要因として、候補遺伝子によっては蛋白質の活性中心が複数の異なるエクソン上に分かれて存在したり、エクソン自体のサイズが大きいことで塩基配列決定の領域が大きくなり、第一世代のシーケンス決定方法ではたちまちコストや労力の許容量を超えてしまうため検体数を増やせなかったことが挙げられる。このように、候補遺伝子解析では解析したい標的配列を増やそうとすると検体数を絞らなければならないので検出力不足に見舞われるというジレンマが常につきまとっている。また、最近のアレイを用いた解析結果が裏づけているように、多因子疾患に関連するバリエーションは必ずしもエクソン上に存在するとは限らないことから、イントロン上や遺伝子の上流、下流に存在する転写調節配列も含めた網羅的な解析ができるような技術革新が以前から望まれていた。

## II. 現在の遺伝子診断を目指す研究

ヒトゲノム全塩基配列決定国際プロジェクトに引き続き 2002 年に開始された国際 HapMap プロジェクト<sup>6)</sup>(<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>)は、白人(コーカサス人)とアフリカ人それぞれ 30 組のトリオ(父、母、子)とアジア人として非血縁者の日本人と中国人それぞれ 45 人ずつ、総計 3 人種・270 人分のハプロタイプ地図を構築することを目標に発足した。ここでいうハプロタイプとは、複数の SNP の間で遺伝的に連鎖している連鎖不平衡(linkage disequilibrium: LD)<sup>5)</sup>状態にあることが統計学的に算出された組み合わせのことをいう。ハプロタイプ情報を取得するためには、人種ごとにゲノム上の SNP を高密度に決定(ジェノタイピング)し、個々の SNP のアレル頻度<sup>6)</sup>情報を取得する必要がある。網羅的なジェノタイピング技術の開発が不可避であった。

アフィメトリクス社が開発したアレイは、十万個以上のオリゴヌクレオチドプローブを基盤(チップ)上に固層化し(半導体のシリコンウエハーチップと全く同じ基盤を用いるところから、DNA チップ<sup>11)</sup>とも呼称される)、それぞれのプローブに相補的にハイブリダイズ<sup>11)</sup>するヒトゲノム由来の DNA 断片を検出する。すなわち、十万枚以上のサザンブロットング解析が 1 回の実験で完了する画期的な技術である。この技術は 1980 年代後半から開発されはじめたが、国際 HapMap プロジェクトにより莫大な資金と労力が投入されたことによって、①アレイに搭載できるプローブの高密度化、②プロジェクトの進展に伴う SNP 情報の更新によるプローブの質の向上、③アレイあたりの解析コストの劇的な低下、がもたらされ急速に進歩した。この技術革新は、2007 年のサイエンス誌の“Breakthrough of the Year”<sup>11)</sup>にも選ばれたように、SNP をマーカーとする一連のケース・コ

ントロール関連解析, いわゆる“ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS; “ジーワス”と発音する)”の成果につながっている。現在までに実に450以上のGWAS研究が実施され多種多様な多因子疾患に関連する2,000以上ものSNPが同定されている<sup>12)</sup>。その先駆けとなった2005年のGWAS第一報は奇しくも眼科領域からの報告であった。この報告では, 約10万個のSNPが搭載された100Kアレイを用いて, 加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) の白人のケース96例とコントロール50例のGWASが実施された<sup>13)</sup>。その結果, 有意なマーカーSNPが同定され, そのSNPと連鎖しているSNPを調べたところ, 補体系の調節因子のひとつであるH因子 (complement factor H: CFH) 遺伝子上のアミノ酸置換を伴うSNPを同定することに成功したのである<sup>13)</sup>。その後, AMDに関連する遺伝子はCFHの他に新たに3種類同定されている<sup>14)</sup>。全身の免疫系に関連するCFHをはじめ, これらの遺伝子とAMD発症のメカニズムとの関連性はいまだ解明されていないが, 遺伝子診断への応用としてこれら4つの遺伝子上のSNPの情報を組み合わせることで発症の危険度が有意に上昇することが示されている<sup>15)</sup>。現在米国では, この研究成果に基づき, AMD発症のリスク判定ゲノム診断薬を実用化する試みが米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) の監督のもとに進められており, 2011年には眼科領域のゲノム診断薬第1号として上市されるとの報道もある。

医学全体を見渡すとゲノム診断薬実用化は始まっている。検査薬としての認可の有無は別に, 正式な医療機関の医師が倫理委員会の承認のもとに関与して患者が利用しているという意味で実用化された例は, 癌化学療法時の効果と有害事象発現予測による個人最適化医療のた

めのUGT1A1遺伝子<sup>16)</sup>, BRCA1・2遺伝子<sup>17)</sup>, HER2遺伝子<sup>18)</sup>, EGFR遺伝子<sup>18)</sup>のゲノム診断とチトクロームP450遺伝子多型による消化器病薬や抗うつ剤などの薬剤効果予測<sup>19)</sup>と, 以下に概説するC型肝炎の治療方針決定のゲノム診断などがある。さらに, 厚労省の高度先進医療の指定を受けている例は, 先天性難聴と低身長症と進行性筋ジストロフィと筋緊張性ジストロフィ症と多発性内分泌腫瘍症2型と先天性血液凝固異常症と網膜芽細胞種と角膜ジストロフィと先天性高インスリン血症と色素性乾皮症と先天異常に対する包括的遺伝子診断など十指に余るほどに増加している。その一方で早くも美容や英才教育のための遺伝子検査という宣伝文句で科学的根拠のない詐欺行為を堂々と実施するビジネスが誕生して放置されていることには戸惑いを禁じ得ない。医学に根ざした注目すべき有望な例として, 2009年の本邦の基礎研究に基づくC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) の標準治療法であるインターフェロン (IFN)  $\alpha$  とリバビリンの併用療法に対する薬剤抵抗性のゲノム診断がある。薬剤抵抗性を規定する宿主側の因子としてIL28B上のSNPが同定された<sup>20)</sup>。IFN療法には有害事象 (副作用) が伴うので, HCV感染症例の中から治療効果が期待されないHCV感染者をあらかじめ選別し, 無駄な治療を回避する「個人最適化医療」の先駆けのひとつとなった成果である (図2)。現在, IFNの治療効果を予測する遺伝子診断として複数の検査会社が受託検査として請け負うまでに商業化されており, 遺伝子診断による個人最適化医療のニーズの高さがうかがわれる。

AMDやIFN療法抵抗性の例のように, ケース・コントロール群がそれぞれ100検体未満の小規模なGWASで遺伝子まで辿り着いたのは, 同定されたSNPの危険度 (オッズ比) が高かった (>2.0) ために危険度の関数である検出力が不足しなかったからに他ならず, 他の大

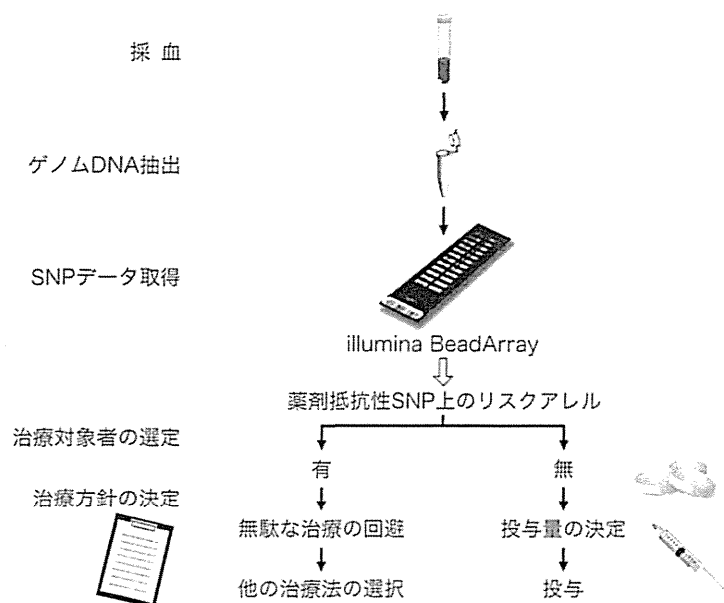


図2 遺伝子診断で薬剤投与の方針を判定する個人最適化医療

血液から抽出したゲノム DNA を用いて、薬剤に対する抵抗性を規定する SNP のジェノタイプングデータを取得し、薬剤抵抗性アレルの有無を判定することによって、薬剤を投与すべきか他の治療法を選択すべきか判断する。治療効果の期待できない患者に対して無駄な治療を行わないことは、患者の QOL の改善だけでなく医療費の削減にもつながる。

多数の多因子疾患における GWAS の結果からは、当初の過度な期待とは裏腹に個々の疾患の発症機序の解明に直結するような遺伝子の同定や診断への応用が期待される SNP の同定には至っていない(図3)。同定されたマーカー SNP それ自体、あるいはマーカー SNP と連鎖している SNP を調べても危険度が小さい(オッズ比で 1.2~1.5 程度)うえに、そもそも大多数の SNP が近傍に遺伝子が存在しない、いわゆる“gene desert (遺伝子砂漠)”領域から同定されたからである<sup>21)</sup>。したがって、世界中の GWAS 研究者がこれらの SNP をいかに生化学的な疾患発症機序と結びつけ、実用可能な遺伝子診断マーカーを同定していくかを模索しているのが現状である。

緑内障についての GWAS の報告をまとめた(表2)。第一報は、2007年に北欧のグループから落屑緑内障(exfoliation glaucoma: XFG)に

関連する遺伝子として、弾性線維であるエラスチンの重合を触媒する *LOXLI* が報告された<sup>5)</sup>。GWAS で同定されたマーカー SNP と連鎖している SNP を精査した結果、*LOXLI* の第一エクソン上にアミノ酸置換を伴う 2 つの SNP が見出された。実に落屑緑内障患者の 99% がこれら 2 つの SNP のアレルの特定の組み合わせ(リスクハプロタイプ)を有していることが判明した<sup>5)</sup>。しかし、落屑緑内障ではない一般集団の 25% でも同一のリスクハプロタイプを保有していることから、遺伝子診断マーカーとして実用化するためにはさらなるマーカー SNP を同定して特異度を上げる必要があると考えられている<sup>4)</sup>。これらの SNP は、日本人落屑緑内障患者においても再現性が確認された<sup>22)~24)</sup>。しかし、このうちのひとつの SNP では、アジア人と白人とでリスクアレルが逆転しており、危険と保護の正反対の作用を有していることが判明



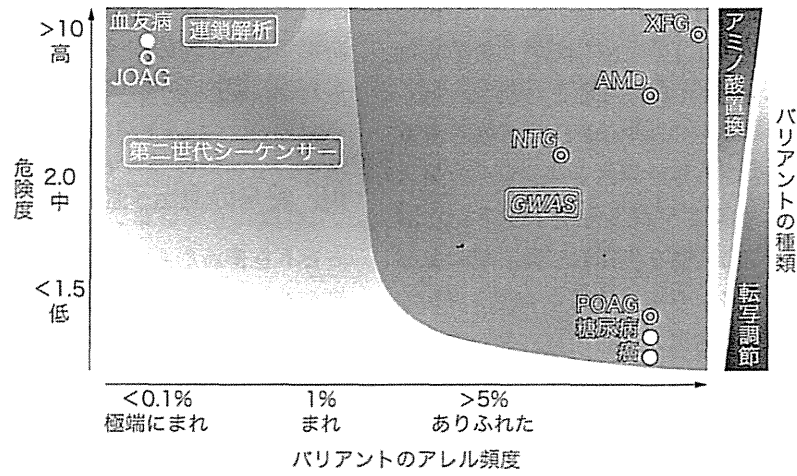


図3 疾患に関連するバリエーションのアレル頻度とその影響力およびバリエーションの同定方法(文献 24 より転載, 一部改変)

例としていくつかの疾患の位置を図中に示した。血友病<sup>35)</sup>とJOAG(若年型開放隅角緑内障)<sup>3)</sup>については連鎖解析の文献を参照し、影響力はロッドスコア(オッズの対数値)、アレル頻度は有病率をもとに図中での位置を推定した。XFG(落屑緑内障)<sup>5)</sup>、AMD(加齢黄斑変性)<sup>13)</sup>、NTG(正常眼圧緑内障)<sup>25)</sup>、POAG(原発開放隅角緑内障)<sup>7)27)</sup>、糖尿病<sup>36)</sup>、癌<sup>37)</sup>についてはGWASの文献を参照し、代表的なバリエーションの情報(影響力はオッズ比)をもとにプロットした。中抜きの丸は眼疾患、白丸はそれ以外の疾患。

表2 緑内障におけるゲノムワイド関連解析\*

発表年月	病型	集団(人種)	検体数 ケース/コントロール	ジェノタイプング マイクロアレイ	関連領域 /遺伝子	文献
2007年9月	落屑緑内障	アイスランド人 (白人)	195/14,474	HumanHap300	LOXL1	5
2009年8月	POAG	日本人 (アジア人)	418/300	GeneChip 500K	1q43, 10p12, 12q21	7
2010年7月	NTG	日本人 (アジア人)	305/355	GeneChip 500K	SRBD1, ELOVL5	26
2010年9月	落屑緑内障	ドイツ人 (白人)	80/80	GeneChip 500K	CNTNAP2	33
2010年10月	POAG	アイスランド人 (白人)	1,263/34,877	HumanHap300 HumanHapCNV370	CAV1, CAV2	27

\*集団や検体数はすべてGWASのみの情報であり再現性試験などの情報は含まれていない。  
NTG: normal tension glaucoma

したことから、落屑緑内障では人種差がもたらす疾患感受性の違いのメカニズムを探る興味深い課題が残されている。

POAGについては、筆者らによる日本人集団を用いたGWASとその再現性実験<sup>7)</sup>および、GWASの報告ではないが、アフロカリビアン

系(アフリカ系人種)のバルバドス人家系を用いた連鎖解析と候補SNPの相関解析を組み合わせた解析結果<sup>25)</sup>が2009年に相次いで報告された。ただし、いずれの報告もPOAGに関連するそれぞれ独自のゲノム領域が提示されているものの、特定の遺伝子と関連づけるには至って

いない。筆者らの検討結果では、他の大多数の多因子疾患と同様に、オッズ比が1.3程度のSNPが遺伝子砂漠領域に同定された<sup>7)</sup>。多くの多因子疾患GWASで同定された疾患関連領域内に遺伝子がないわけであるが、現在のゲノム医学による考察は、「発症を制御する何らかの遺伝子発現調節機構を担う転写調節配列または直接何らかの蛋白質や生体高分子に結合してその活性を制御するマイクロRNAをコードする配列が領域内に潜んでいると考える以外に可能性がない」ということになる。また、日本人の正常眼圧緑内障(normal tension glaucoma: NTG)症例を用いたGWASでは、*SRBD1*と*ELOVL5*の2種類の遺伝子がNTG関連遺伝子として同定されており<sup>26)</sup>、別集団での再現性の検証がまたれるところである。さらに、ごく最近、表向きPOAG症例数は大規模だが診断がきわめて粗放なために落屑緑内障症例の大量混入などの問題点が隠せないGWAS研究例が北欧のグループによって発表され、POAG関連遺伝子として細胞膜直下の蛋白質であるカベオリンをコードする*CAVI*と*CAV2*が報告された<sup>27)</sup>。本研究で同定された*CAVI*と*CAV2*の近傍に位置するマーカーSNPは、中国人集団でも再現性が確認されたが、中国人でのアレル頻度は1.8%であり、約30%である白人よりもはるかに低いまれなバリエーションであった。さらにこのマーカーSNPは、日本人ではそもそもバリエーションですらないことが記載されており<sup>27)</sup>、人種差が改めて浮き彫りになった。欧米諸国からの表面上大規模なGWAS結果に惑わされることなく、日本人に実益のある遺伝子診断システムを構築するためには、日本人固有のバリエーションと世界共通のバリエーションを引き続き探索していく意義と重要性を強く認識させられている。上記の課題解決のために現在1000Kアレイ実験が進行中であり、人種差の課題が解決されると同時に日本人の一般的なPOAG発症リスク

診断アレイや進行速度予測アレイが臨床試験を開始できる学術的レベルに到達することが期待される。

### III. 将来の遺伝子診断

ヒトを含めたあらゆる生物種のゲノムが第二世代シーケンサーを用いて解析されはじめてからというもの、そのデータ産生量やカバー率の高さから既存の概念を超越する数々の新発見もたらされている。欧米諸国のGWAS研究者は、GWASで同定された疾患に関連する遺伝子砂漠領域を精査する手段として精力的に第二世代シーケンサーを使用しはじめている。遺伝子砂漠領域には少なくとも統計学的に疾患に関連づけられるSNPが存在する以上、アレイの感度では捉えきれない何らかの遺伝子発現調節機構を担う転写調節配列または直接何らかの蛋白質や生体高分子に結合してその活性を制御するマイクロRNAをコードする配列が潜んでいる可能性が高いからである。

現在市販されているアレイには、国際HapMapプロジェクトの情報<sup>6)</sup>をもとに、①マイナーアレル頻度(minor allele frequency: MAF)<sup>28)</sup>が5%以上のありふれたSNP、②連鎖している複数のSNPが存在する範囲(LDブロック)<sup>29)</sup>の情報をもとに抽出した領域を代表する“タグ”SNP、③ハイブリダイゼーション法によるジェノタイピングデータが高精度に再現性高く検出できるSNP、が50万~100万個厳選されて搭載されている。アレイの主要な開発元であるアフィメトリクス社とイルミナ社は両社ともに米国の企業であり、アレイ上のSNPは白人集団に至適化されている。すなわち、MAFは白人集団における5%以上に設定されており、タグSNPも白人集団のLDブロック情報をもとに優先的に選別されている。その結果、日本人にとってはそもそもSNPでない

ものが約3~4割もアレイに搭載されており、筆者らはPOAGのGWAS<sup>27)</sup>でも、重症薬疹のひとつであるStevens-Johnson症候群のGWAS<sup>28)</sup>においても、実験データは取得したものの約35%の搭載SNPを解析から除外する経験をしている。アレイで取得できる情報は、広範なヒトゲノム全体をかなりの密度でカバーしているので現在最も低コストで多症例を検証できる特長がある一方、実験上の技術と注意力が少しでも不足するとノイズが大きくなり解析困難となる特性を有することや、あくまでも理論値であるLDブロック情報に準拠していることから、特に白人以外のデータを取得する場合にはゲノム情報の一部の解像度が粗くなってしまふことに注意が必要である。それでもなお、MAFが5%以上のSNPを多数症例でスクリーニングする手段としての費用と労力面でのアレイの優位性は今後とも揺らがないので、これから世の中に出てくる多くの多因子疾患のリスク判定をするゲノム診断薬は、注意深く行われたアレイ実験の成果に準拠すると予想される。

一方、第二世代シーケンサーでは、SNPだけでなくその前後も含めた全塩基配列というこれ以上ない高精度なデータを取得できるので、理論的にはヒトゲノム上の全バリエーションを検出することが可能である<sup>29)</sup>(図3)。MAFが5%以上のSNPをマーカーとするGWASの成果として、一部の疾患を除いて疾患の発症原因を直接的に説明し得る遺伝子情報は得られなかったが、少なくとも遺伝子の発現調節機構に関連するゲノム領域はある程度絞り込めた。また、これまでの連鎖解析では主にメンデル遺伝病を代々有する家系に特有の遺伝子のエキソン上に存在する危険度の高いまれなバリエーションを数々見出している。第二世代シーケンサーは、両者の深化と両者間に存在するギャップを補完する技術になることが期待されている(図3)。しかし、第二世代シーケンサーといえどもヒト全ゲノムを

高いカバー率で網羅する高精度なシーケンスデータを多検体から取得することは検体処理能力およびコストの面から困難である。そこで、シーケンサーに供する試料の前処理として、研究者が興味のある領域あるいは特定の構成成分(たとえば遺伝子のエキソン)をゲノムから特異的かつ効率的に捕獲する技術(標的配列濃縮法)の開発こそが研究の質を決定づける。筆者らによる標的配列濃縮方法の開発については別稿に記載している<sup>30)</sup>。欧米諸国では、第二世代シーケンサーと標的配列濃縮法を組み合わせた新技術を駆使しながら、まずはGWASでは明かされなかった多因子疾患の生化学的な発症機序を力づくで解明しようとしている<sup>31)</sup>。また、これまでに発表されたヒトでの次世代シーケンサーを用いたほとんどすべての成果は、ゲノムDNAを使い切ると研究完成責任と再現義務を果たせなくなるので、ヒト白血球細胞の細胞株化を行ったうえで細胞株から抽出したゲノムDNAを用いて塩基配列を決定している。多数症例を細胞株化できるかどうかが一種の参入障壁となるが、筆者らは緑内障症例と対照例約4,000例の細胞株化を完了している。

緑内障のような多因子疾患は、ひとつひとつの影響力が微弱な数十~数百におよぶバリエーションから構成される遺伝因子とさまざまな環境因子とが複雑に作用し合って発症することが予想される。たとえば、遺伝因子の影響が強いとされている1型糖尿病ですら、現在までに40種類以上のSNPが複数の大規模GWASの統合解析によって割り出されている<sup>32)</sup>。第二世代シーケンサーによって多因子疾患の発症に関連する全バリエーションが同定され尽くした後は、従来の分子情報網(たとえば、教科書に模式図として示されているシグナル伝達系)にマイクロRNAの情報網が加わる多彩なバリエーション情報を統合的に理解する必要性に迫られる。そのような場面では、アレイを用いた遺伝子発現解

析で近年普及してきたパスウェイ解析<sup>注7)</sup>の経験が役に立つ。そして、これらの情報網を統合し終えた暁には、ゲノム学の立場からの緑内障病型分類が可能になる学問深化と分子標的治療薬の開発開始と同時に、複数の多因子疾患が共有している「ハブ」となるようなバリエーションが整理されて浮かび上がってくるに違いない。このような精鋭バリエーションを無数のバリエーションの中から厳選することで、まず先行する1000Kアレイ研究成果で作られる一般的リスク判定診断チップに比べて精度の高い個人最適化医療のためのより広い個人差に対応できる緑内障遺伝子診断チップが現実味を帯びてくる。なお、ゲノム検査薬のプラットフォームは、費用と安定性から搭載SNP数を抑えて信頼性を向上させたアレイが主流を占めることが確実である。イルミナ社からFDAの認可を取得した数百のバリエーションを短時間で決定できる遺伝子診断に特化したアレイ機器が登場し、アフィメトリクス陣営やその他陣営も近未来の遺伝子診断市場を見据えている。ハード面の準備は着々と進行しているため、緑内障診断アレイの開発に向けてソフト面で本邦の研究成果が貢献できることを願ってやまない。

#### IV. 遺伝カウンセリング体制の必要性

これまでの遺伝カウンセリングは遺伝病や癌、婦人科領域の出産に絡んだ疾患が中心であったが、発症リスクのみならず薬剤感受性や副作用発現についてもゲノム診断の範囲が広がりつつある。緑内障領域に関しては、これまではあくまで研究目的であったゲノム診断が、近未来に実際に検診や診療の中で実施されることが予想される。遺伝子診断アレイが実用化されれば、緑内障の発症リスクが高いかどうか、また視野障害進行リスクが高いかが判定可能になる。少量の血液だけで判定可能な診断アレイが

実用化されれば、およそ9割の患者が自分は緑内障であると気づいていないという特性のある緑内障<sup>9)</sup>の対策のために人間ドックや健康診断の血液検査のメニューに組み入れられることも予想される。緑内障の発症リスクが高いと判定が出た場合に、早期発見と早期治療開始につながる圧倒的な恩恵がある一方、さまざまな問題が生じる可能性がある。緑内障発症リスクの個人情報取り扱いを誤れば、就職や結婚・出産、一般の生命保険の加入などに影響する可能性がある。また、遺伝子診断の結果を聞いただけで未発症にもかかわらず精神的なダメージを受けるケースの出現も想定される。遺伝子診断実現と同時に個人情報管理の徹底と遺伝カウンセリングの重要性が増してくる。既に遺伝疾患を扱う大きな施設では院内に遺伝カウンセリングが開設されている。施設によって多少の違いはあるが、約1時間のカウンセリング(保険適応なし。値段は施設によって異なる。1回につき2,500~5,000円程度)を複数回(1度であれば正しく理解できない可能性があるため)受ける。

遺伝カウンセリングには臨床遺伝専門医制度(<http://jbmg.org/>)が存在し、その資格を持った医師が中心となって相談にあたる。内科や外科、小児科、婦人科では臨床遺伝専門医の資格を持っている医師がある程度存在するのに対し、本資格を有する眼科医はごく少数であるのが現状である。これまでは、臨床遺伝専門医の受験資格を得るためには「3年以上の日本人類遺伝学会あるいは日本遺伝カウンセリング学会の会員歴」が必要で、かつ「遺伝症例20症例以上の経験および3年以上の遺伝カウンセリングにあたった実績および遺伝疾患に関する発表論文/学会発表が必要」などとされていたためハードルがかなり高かった。しかしながらこのたび、2011年から2013年までと暫定的ではあるが受験資格が緩和されることになった。暫定制度では、「各科の専門医を取得後3年以上」を受験

資格とし、受験者は「臨床遺伝専門医制度委員会」に、「資料(10例の既実践した遺伝医療に関するまとめで、この10例に関しては、稀少な単一遺伝子病や染色体異常などに限らず、生活習慣病、精神疾患など発症における遺伝要因が関与する多因子疾患を含む)を提出」して審査を受け、受験資格認定を受けることになる。「受験申請時には日本人類遺伝学会あるいは日本遺伝カウンセリング学会の入会が条件」になった。よって眼科専門医も臨床遺伝専門医の資格を取得しやすくなった。眼科領域の疾患に端を発する遺伝カウンセリングを他科出身の専門医に任せるのではなく、眼科専門医も積極的に遺伝カウンセリングに参画していく必要があり、この臨床遺伝子専門医の受験資格緩和は追い風となる。

## おわりに

緑内障は特定の遺伝子で原因が説明できる疾患ではなく多因子疾患の代表格といえる。落屑緑内障の *LOXLI* 遺伝子についてはどの人種でも高い危険度を有するが、人種によってリスクアレルが逆転(危険と保護の反対の作用)する SNP があること、症候群のまま終わるか緑内障発症に至るかの予測がまだにできないことなど、解明すべき課題が残る。原発開放隅角緑内障に関しては報告されはじめた数個の SNP の危険度は低く、人種差があり、さらなる研究結果がまたれる。マイナーアレル頻度が5%以下のバリエーションに関しては、症例数を増やしての GWAS や次世代シーケンスでの検証が必要と考えられる(図3)。

緑内障の遺伝子診断は、研究目的で特定の患者にしか行われていなかった段階から、一般検診で少量の血液で発症/進行予測ができる時代に変貌することは確実である。その延長線上には、信頼できる診療記録と投薬記録をゲノム情

報と結びつける研究に活用可能な形態で保有する研究グループの努力によって、薬剤の感受性・有害事象発現も遺伝子診断できる時代がやってくる。緑内障を含む多因子疾患のゲノム診断は、発症の多ヒット説のような誕生後の体細胞で次々に起こるダイナミックなゲノム上の変異の増加は想定しておらず、原則的に一生不変が前提な遺伝因子を得ることのみを視野に入れている。一生不変が前提なゲノム情報を安全で安定な形で保存すれば検査を何度も受ける必要はない。近い将来、緑内障診断アレイが多くの人に活用され、緑内障早期発見・早期治療への橋渡しとして、そして治療に真に役立つように、ひいては視野機能障害を予防して QOL を高く保ちつつ医療費や社会福祉費を抑制することに役立つことを切に願っている。

## 脚注

注1) DNA マイクロアレイ：何十万個というオリゴヌクレオチドプローブ(20~30塩基からなる DNA 断片)が整然と基盤(チップ)やスライドガラス上に共有結合で固相化されたもの。たとえば、アフィメトリクス社はチップ上に、イルミナ社はマイクロビーズ上にプローブを固相化した商品を販売しており、それぞれ GeneChip, BeadArray という商品名で商標登録して2社がしのぎを削っている。これらのアレイに断片化したヒトゲノム DNA を反応させて洗浄することにより、アレイ上のプローブと相補鎖(AとT, CとGの組)を形成(ハイブリダイズ)した DNA 断片のみが検出できる。SNP を検出する場合には、プローブ配列の中央に SNP を配置し、ヒトゲノム由来の DNA 断片がどのジェノタイプのプローブとハイブリダイズしたかを検出することによって、その検体がどの配列の SNP を有するかを決定(ジェノタイプピング)することができる。

注2) 第二世代シーケンサー：第二世代

シーケンサーは、①何百万個という DNA 断片の塩基配列を同時に決定し、②ヒトゲノムプロジェクトによって決定されたヒトの参照配列(リファレンス配列)に①で塩基配列が決定した DNA 断片を貼付(アライメント)し、その DNA 断片がリファレンス配列のどこ由来の配列かを決定する(図1右下)。①を可能にした技術として、たとえばイルミナ社の Genome Analyzer では、スライドガラス上で何百万個という DNA 断片を一塩基ずつ伸長させながら、その伸長反応ごとに蛍光を画像として検出し配列を決定していく<sup>39)</sup>。現在は、第二世代シーケンサーの1ランでヒトゲノム(33億塩基対)全体を約20回のカバー率で配列決定できる水準まできている。

注3) バリエーション(variant)：生物どうしの個体差を規定する遺伝的な塩基配列の違いの総称。バリエーションには、一塩基だけ異なるものから数塩基から数千塩基にも及ぶ挿入や欠失、同じ配列が繰り返される回数などの種類がある。一塩基多型(single nucleotide polymorphism：SNP)もバリエーションの一種で「ある集団で1%以上の頻度で認められるバリエーション」として定義されている。これに対して“変異(mutation)”は、癌細胞などの体細胞で認められる後天的に新生した塩基配列の違いとして区別することが多い。

注4) サンガー法：第一世代のシーケンシング技術。発明者の名前からサンガー法、あるいはその原理からダイデオキシ法とも呼ばれる。配列を決定したい鋳型 DNA をポリメラーゼで伸長させる際に、基質として通常のデオキシヌクレオチド(dNTP、NはA、G、C、Tのいずれか)とともに3'末端側のOH基がないのでそれ以上伸長できないダイデオキシヌクレオチド(ddNTP)を混ぜることによって、たとえば鋳型 DNA の A 塩基に相補的な ddTTP を取り込むとそこで伸長反応が停止し、そこで長さ

と蛍光色素を1対1対応させる。ddNTPにはそれぞれ異なる4色の蛍光色素がラベルされており、蛍光色素を検出することで一塩基ずつ鋳型 DNA の塩基配列が決定されていく。1回のシーケンシングで400~1,000塩基/サンプルの配列が決定できる。

注5) 連鎖不平衡：同一染色体上のある一定範囲に存在する複数の SNP の間にはランダムではない相関が認められ、この関係にあることを連鎖不平衡(linkage disequilibrium：LD)という。LDは人種ごとの減数分裂時の相同染色体組換えの記録であり、厳密なLDが及ぶ範囲内ではその人種の歴史で組換えが生じていないことを意味する。LDは数kbから時には数百kbにもおよび、その範囲を視覚化する計算方法も開発されている(視覚化されたLDの範囲を「LDブロック」と呼ぶ)。LDブロックは、相関解析で同定されたマーカー SNP から真の疾患原因 SNP を導き出すうえで重要な役割を果たしている。

注6) アレル頻度：たとえば、ある SNP のアレル(対立遺伝子)がAとTであった場合、ある集団でAまたはTを有する人数の割合をアレル頻度と呼ぶ。このうち、頻度が低いほうのアレルをマイナーアレルと呼び、疾患に関連する SNP を考える場合、一般的にマイナーアレルがリスクアレルとして定義される。

注7) パスウェイ解析：現在は、アレイで取得した大量の遺伝子発現データの相互関係を網羅的に解析する方法として用いられている。発現データに限らず、公共データベース上の利用可能なあらゆるデータ(実験データに限らず文献情報なども)を統合して遺伝子、蛋白質、化合物などの間に存在し得る相互関係(促進、抑制、結合、阻害、触媒など)をネットワークとして結びつける方法。

文 献

- 1) Stone EM, Fingert JH, Alward WL et al : Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275 : 668-670, 1997
- 2) Rezaie T, Child A, Hitchings R et al : Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 295 : 1077-1079, 2002
- 3) Monemi S, Spaeth G, DaSilva A et al : Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet* 14 : 725-733, 2005
- 4) Fan BJ, Wiggs JL : Glaucoma : genes, phenotypes, and new directions for therapy. *J Clin Invest* 120 : 3064-3072, 2010
- 5) Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P et al : Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science* 317 : 1397-1400, 2007
- 6) Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR et al : A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449 : 851-861, 2007
- 7) Nakano M, Ikeda Y, Taniguchi T 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* 106 : 12838-12842, 2009
- 8) Sheffield VC, Stone EM, Alward WL et al : Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. *Nat Genet* 4 : 47-50, 1993
- 9) Iwase A, Suzuki Y, Araie M et al : The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese : the Tajimi Study. *Ophthalmology* 111 : 1641-1648, 2004
- 10) Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH et al : Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 360 : 1113-1124, 2009
- 11) Pennisi E : Breakthrough of the year. Human genetic variation. *Science* 318 : 1842-1843, 2007
- 12) Ku CS, Loy EY, Pawitan Y et al : The pursuit of genome-wide association studies : where are we now? *J Hum Genet* 55 : 195-206, 2010
- 13) Klein RJ, Zeiss C, Chew EY et al : Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308 : 385-389, 2005
- 14) Swaroop A, Branham KE, Chen W et al : Genetic susceptibility to age-related macular degeneration : a paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum Mol Genet* 16 (R2) : R174-182, 2007
- 15) Maller J, George S, Purcell S et al : Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38 : 1055-1059, 2006
- 16) Gutman S, Kessler LG : The US Food and Drug Administration perspective on cancer biomarker development. *Nat Rev Cancer* 6 : 565-571, 2006
- 17) Fackenthal JD, Olopade OI : Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* 7 : 937-948, 2007
- 18) Musgrove EA, Sutherland RL : Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9 : 631-643, 2009
- 19) Jain KK : Applications of AmpliChip CYP450. *Mol Diagn* 9 : 119-127, 2005
- 20) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M et al : Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41 : 1105-1109, 2009
- 21) Frazer KA, Murray SS, Schork NJ et al : Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 10 : 241-251, 2009
- 22) Hayashi H, Gotoh N, Ueda Y et al : Lysyl oxidase-like 1 polymorphisms and exfoliation syndrome in the Japanese population. *Am J Ophthalmol* 145 : 582-585, 2008
- 23) Ozaki M, Lee KY, Vithana EN et al : Association of LOXL1 gene polymorphisms with pseudoexfoliation in the Japanese. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 3976-3980, 2008
- 24) Mori K, Imai K, Matsuda A et al : LOXL1 genetic polymorphisms are associated with exfoliation glaucoma in the Japanese population. *Mol Vis* 14 : 1037-1040, 2008
- 25) Jiao X, Yang Z, Yang X et al : Common variants on chromosome 2 and risk of primary open-angle glaucoma in the Afro-Caribbean population of Barbados. *Proc Natl Acad*

## 眼科

- Sci U S A 106 : 17105-17110, 2009
- 26) Meguro A, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Bahram S : Genome-wide association study of normal tension glaucoma : common variants in SRBD1 and ELOVL5 contribute to disease susceptibility. *Ophthalmology* 117 : 1331-1338. e5, 2010
- 27) Thorleifsson G, Walters GB, Hewitt AW et al : Common variants near CAV1 and CAV2 are associated with primary open-angle glaucoma. *Nat Genet* 42 : 906-909, 2010
- 28) Ueta M, Sotozono C, Nakano M et al : Association between prostaglandin E receptor 3 polymorphisms and Stevens-Johnson syndrome identified by means of a genome-wide association study. *J Allergy Clin Immunol* 126 : 1218-1225, 2010
- 29) Singleton AB, Hardy J, Traynor BJ et al : Towards a complete resolution of the genetic architecture of disease. *Trends Genet* 26 : 438-442, 2010
- 30) 中野正和, 田代啓 : 大規模シーケンサー解析用ヒトゲノム標的配列濃縮法. *実験医学* 28 : 3147-3153, 2010
- 31) Manolio TA, Collins FS, Cox NJ et al : Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461 : 747-753, 2009
- 32) Barrett JC, Clayton DG, Concannon P et al : Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41 : 703-707, 2009
- 33) Krumbiegel M, Pasutto F, Schlötzer-Schrehardt U et al : Genome-wide association study with DNA pooling identifies variants at CNTNAP2 associated with pseudoexfoliation syndrome. *Eur J Hum Genet* 19 : 186-193, 2010
- 34) Metzker ML : Sequencing technologies-the next generation. *Nat Rev Genet* 11 : 31-46, 2010
- 35) Perrotta PL, Svensson AM : Molecular diagnostics in hemostatic disorders. *Clin Lab Med* 29 : 367-390, 2009
- 36) Wellcome Trust Case Control Consortium : Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447 : 661-678, 2007
- 37) Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J et al : Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet* 39 : 989-994, 2007

\*

\*



