

201224045A

厚生労働科学研究費補助金
感覚器障害研究事業

「緑内障統合的分子診断法の確立と実証」

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木下 茂

平成 25(2013)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
感覚器障害研究事業

「緑内障統合的分子診断法の確立と実証」
に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木下 茂

平成 25(2013)年 3 月

目 次

I.	総括研究報告	
	「緑内障統合的分子診断法の確立と実証」に関する研究	
	木下 茂	1
II.	分担研究報告	
	田代 啓	11
	長崎 生光	17
	田中 光一	21
	森 和彦	25
	中野 正和	34
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV.	研究成果の刊行物・別刷	47

[I]

平成 24 年度 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)
総合研究報告書

「緑内障統合的分子診断法の確立と実証」

に関する研究

研究代表者 木下 茂

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 教授

研究要旨

緑内障は本邦における中途失明原因の第1位であり、40歳以上の有病率は広義の原発開放隅角緑内障（広義POAG）では3.9%、70歳代では8.0%と加齢に伴い増加する。緑内障の発症を簡便な血液検査で予測できれば早期診断・治療により失明が予防でき、視覚障害に伴う医療費や社会福祉関連費の大幅な削減が期待できる。我々は、5,000例を超える血液検体（細胞株樹立済み）と過去15年以上蓄積してきた臨床情報をもとに、緑内障の主要病型についてのゲノムワイド関連解析を行い、正常眼圧緑内障（NTG）に特有な塩基配列の違い（バリエーション）を独自に見出している。これまでに、緑内障患者の血漿中で有意に上昇している4種類のサイトカインを同定し、バリエーションのジェノタイプ情報

（離散変数）とサイトカイン量（連続変数）を統合して発症リスクを予測する診断アルゴリズムを開発し、特許出願している。また本研究では、緑内障の主要病型に対応するプロトタイプ診断チップを作製し、他施設と連携してその有用性の実証を目指す。狭義原発開放隅角緑内障（POAG）のバリエーションは未同定であり、オッズ比が低いことが想定されるため、コピー数の違いのバリエーション（CNV）についても精査する。更には、血液診断法として末梢血白血球の網羅

的発現解析を実施し、クラスター解析を試みる。今年度はデータ取得を中心に解析を実施し、分担・長崎を始め統計学の専門家と協力しながら統合的診断アルゴリズムの強化・至適化を図る。

A. 研究目的

本大学附属病院緑内障専門外来にて、緑内障散布取得および臨床データの蓄積を継続する。また、緑内障統合的分子診断法を確立・実証するために、統計学的検出力の高い広義POAGのGWASを新たに実施し、より診断精度の高いジェノタイプデータを取得することを試みる。

B. 研究方法

緑内障専門外来に受診する患者の臨床データは専用カスタマイズされたソフトを構築しており、入力され、その蓄積データは10年を超えている。引き続き、DNA取得とデータ蓄積は緑内障専門外来にて継続していく。2005年以来、我々が独自に収集している検体は5,000例を超えている。その検体の中から詳

細な緑内障診断を行っている。さらには正常者もボランティアで募り、緑内障専門外来と同じだけの緑内障精密検査を施行して、厳密な正常者を選別し、統計解析に用いる。これらの厳密な診断のもとに選別された総計2,126検体を、アフィメトリクス社のDNAマイクロアレイ

(Genome-Wide Human SNP

Array 6.0) を用いて906,600個の

SNPのジェノタイプを決定した。次に、緑内障専門医による厳格な診断

により広義POAG群833例と対照群686例を厳選し、厳格なフィルター

により抽出した653,519個の高精度なジェノタイプデータを用いて相関

解析を実施した。更に、眼圧データに基づいて疾患群を眼圧の高い群

(HPG) と低い群 (NPG) の2群に

分けて相関解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究では患者由来の臨床情報とゲノム情報を取り扱うので、関連する倫理と法令を遵守しながら実行する。

C. 研究結果

GWASの結果、ヒト染色体上の9p21.3領域に存在するCDKN2B-AS1上にボンフェローニ補正を超える有意なSNPが集中的に同定された。次に、広義POAG群を眼圧の高いHPG群330例と正常範囲のNPG群503例の2群に分けた相関解析を実施した結果、広義POAGのGWASで検出されたSNPと同一のCDKN2B-AS1上のSNPがNPG群でのみ有意に検出された。

D. 考察

統計学的検出力の高いGWASを新たに実施したことにより、広義POAGに非常に強い相関を示すSNPを同定することに成功したことから、

緑内障の統合的分子診断法の精度の向上に寄与することが期待される。一方、これらのSNPはNPG群に特異的であったことから、NPGとHPGを識別することが可能な有用なSNPが同定されたと考えられる。

E. 結論

緑内障統合的分子診断法の確立・実証に寄与し得る精度の高いCDKN2B-AS1上のSNPを同定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueta M, Tokunaga K, Sotozono C, Sawai H, Tamiya G, Inatomi T, Kinoshita S: HLA-A*0206 with TLR3 Polymorphisms Exerts More than Additive Effects in

- Stevens-Johnson Syndrome with Severe Ocular Surface Complications. *PLoS One*. 2012; 7(8):e43650.
2. 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. and Tashiro K. An approach to predict the risk of glaucoma development by integrating different attribute data. *SpringerPlus*, 1: 41, 2012.
 3. Ueta M, Tamiya G, Tokunaga K, Sotozono C, Ueki M, Sawai H, Inatomi T, Matsuoka T, Akira S, Narumiya S, Tashiro K, Kinoshita S: Epistatic interaction between Toll-like receptor 3 (TLR3) and prostaglandin E receptor 3 (PTGER3) genes. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129(5): 1413-1416.e11.
 4. Tohkin M, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E, Kurose K, Nishikawa J, Hasegawa R, Aihara M, Matsunaga K, Abe M, Furuya H, Takahashi Y, Ikeda H, Muramatsu M, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Ikezawa Z: A whole-genome association study of major determinants for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Pharmacogenomics J*. 2011 [Epub ahead of print]
 5. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Om N, Ueno M, Imai K, Adchi H, Kageyama M, Mori K, Kinoshita S, and Tashiro, K. Common variants in CDKN2B-AS1 associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by

- genome-wide association studies in Japanese. PLoS ONE, 7: e33389, 2012.
6. 中路進之助、上田真由美、外園千恵、稲富 勉、木下 茂. 眼合併症を伴う日本人Stevens-Johnson症候群のHLA classI解析. 日本眼科学会雑誌, 116(6): 581-587, 2012.
 7. 吉川晴菜、森 和彦、池田陽子、上野盛夫、木下 茂. 3種類の緑内障視野進行判定プログラムの比較検討. あたらしい眼科 29(6):840-843, 2012
2. 学会発表
 1. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Omi N, Adachi H, Ueno M, Mori K, Kinoshita S, and Tashiro K. Common genetic variants of primary open-angle glaucoma in Japanese population. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics San Francisco (Nov, 6-10 2012).
 2. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Imai K, Nakano M, Fuwa M, Yoshii K, Yagi Y, Tokuda Y, Tashiro K, and Kinoshita S. Association of risk alleles of glaucoma marker SNPs with morphological characters of the optic disc. 10th Congress of the European Glaucoma Society (EGS) Copenhagen Denmark (June.18-22,2012).
 3. Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Imai K, Nakano M, Tokuda Y, Omi N, Adachi H, Tashiro K, and Kinoshita S. Genome-wide association study on primary open-angle glaucoma with a 1000K gene chip. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and

- Ophthalmology Florida (May 6-10 2012).
4. Maruyama Y, Mori K, Yoshikawa H, Ikeda Y, Ueno M, Tada K, Kinoshita S. Effects of long-term topical prostaglandin therapy on central corneal thickness. 10th Congress of the European Glaucoma Society (EGS), Copenhagen, Denmark (June.18-22,2012).
 5. Yoshikawa H, Ueno M, Ikeda Y, Oya T, Mori K, Kinoshita S. Lipid peroxidation in aqueous humor obtained from primary open-angle glaucoma patients and pseudoexfoliative glaucoma patients. 10th Congress of the European Glaucoma Society (EGS), Copenhagen, Denmark (June.18-22,2012).
 6. Ueno M, Sasaki M, Maruyama K, Ikeda Y, Mori K, Kinoshita S. A case of superior segmental optic hypoplasia(SSOH)-like change of the optic disc induced by transient ocular hypertension. 10th Congress of the European Glaucoma Society (EGS), Copenhagen, Denmark (June.18-22,2012).
 7. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Yoshikawa H, Maruyama Y, Kinoshita S. Evaluation of Optic Disc Morphology with HRT-II of Middle-Age or Older Japanese Normal Subjects. AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, Chicago, IL, USA, (Nov.10-14,2012).
 8. Maruyama Y, Mori K, Yoshii H, Yoshikawa H, Ikeda Y, Ueno M, Tashiro K, Kinoshita S. Analysis of Hematological and Biochemical Data in Primary Open - Angle

- Glaucoma Patients. Asia Pacific Glaucoma Congress. Bali, Indonesia (Dec.7-9,2012).
9. Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Maruyama Y, Yoshikawa H, Kinoshita S. Surgical Procedure For Secondary Angle - Closure Glaucoma Due To Soemmering's Ring. Asia Pacific Glaucoma Congress. Bali, Indonesia (Dec.7-9,2012).
10. Ishida G, Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Maruyama Y, Yoshikawa H, Kato Y, Kinoshita S. Evaluation Of Optic - Nerve Disc Size In Normal Japanese Subjects. Asia Pacific Glaucoma Congress. Bali, Indonesia (Dec.7-9,2012).
11. Kato Y, Tada K, Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Maruyama Y, Yoshikawa H, Ishida G, Kinoshita S. Evaluation Of Age - Related Morphological Change Of The Anterior Chamber In Japanese Normal Subjects. Asia Pacific Glaucoma Congress. Bali, Indonesia (Dec.7-9,2012).
12. 池田陽子、森 和彦、上野盛夫、今井浩二郎、中野正和、徳田雄市、大見奈津江、佐藤隆一、田代 啓、木下 茂. CDKN2B-AS1の病型別原発開放隅角緑内障全ゲノム関連解析. 第66回日本臨床眼科学会、京都.2012.10.25-28
13. 森 和彦、池田陽子、上野盛夫、今井浩二郎、中野正和、徳田雄市、佐藤隆一、足立博子、田代 啓、木下 茂. 原発開放隅角緑内障の1000Kチップによる全ゲノム関連解析. 第66回日本臨床眼科学会. 京都 2012.10.25-28
14. 吉井健吾、池田陽子、森 和彦、上野盛夫、丸山悠子、

- 吉川晴菜、中野正和、大見奈津江、徳田雄市、田代啓、木下 茂。原発開放隅角緑内障患者における血液生化学データの解析。第23回日本緑内障学会。金沢。2012.9.28-30
15. 足立博子、丸山悠子、米田一仁、丸山和一、木下 茂、中野正和、田代啓。網膜における血管新生に関連する遺伝子の網羅的発現解析。第59回日本生化学会近畿支部例会。京都。2012.5.19
16. 加藤浩晃、森和彦、池田陽子、上野盛夫、木下 茂。瘢痕結膜症例に対するテノン囊前転を併用した線維柱帯切除術の検討。第35回日本眼科手術学会総会。名古屋。2012.1.27-29
17. 池田陽子、森和彦、上野盛夫、吉川晴菜、丸山悠子、多田香織、木下 茂。円蓋部基底濾過胞再建術施行症例の臨床的検討と早期手術成績。第35回日本眼科手術学会総会。名古屋。2012.1.27-29
18. 吉川晴菜、森和彦、池田陽子、上野盛夫、丸山悠子、多田香織、木下 茂。ProgressorRの局所トレンド解析による進行判定の検討。第116回日本眼科学会総会。東京。2012.4.5-8
19. 糸井素啓、上野盛夫、池田陽子、吉川晴菜、丸山悠子、森和彦、木下 茂。EDI-OCTを用いた篩状板の解析。第82回京都府立医科大学同窓眼科集談会ならびに明交会総会。京都。2012.9.22
20. 中山知倫、森和彦、池田陽子、上野盛夫、吉川晴菜、丸山悠子、木下 茂。屈折変化に伴う視神経乳頭形状解析上の問題点の検討。第82回京都府立医科大学同窓眼科集談会ならびに明交会総会。京都。2012.9.22
21. 加藤浩晃、森和彦、上野盛夫、池田陽子、山崎俊秀、木下 茂。眼内レンズ縫着術を併用した線維柱帯切除術の術後成績。第23

- 回日本緑内障学会.金沢.
2012.9.29
22. 丸山悠子、丸山和一、森 和彦、吉川晴菜、池田陽子、上野盛夫、木下 茂. ポスナーシュロスマン症候群における角膜内皮細胞密度と観血的治療. 第23回日本緑内障学会. 金沢.2012.9.29
23. 吉川晴菜、上野盛夫、池田陽子、丸山悠子、大矢友子、森 和彦、木下 茂. 緑内障患者における前房水中の酸化ストレスマーカーとしての4-hydroxy2nonenalの検討. 第23回日本緑内障学会. 金沢. 2012.9.28-30
24. 津崎さつき、池田陽子、森 和彦、上野盛夫、丸山悠子、吉川晴菜、高橋純子、奥田玲子、木下 茂. 緑内障専門クリニックにおける受診患者背景の検討. 第23回日本緑内障学会. 金沢. 2012.9.28-30
25. 上野盛夫、池田陽子、吉川晴菜、丸山悠子、森 和彦、木下 茂. 白内障手術併用線維柱帯切除術による眼軸長の変動. 第23回日本緑内障学会. 金沢. 2012.9.28-30
26. 中川紘子、稲富 勉、森 和彦、池田陽子、上野盛夫、木下 茂. 緑内障術後水疱性角膜症に対する角膜内皮移植術の臨床成績. 第23回日本緑内障学会. 金沢. 2012.9.28-30
27. 高橋純子、池田陽子、森 和彦、上野盛夫、丸山悠子、吉川晴菜、木下 茂. 正常者における加齢に伴う視神経乳頭形状変化の検討. 第23回日本緑内障学会. 金沢. 2012.9.28-30
28. 加藤浩晃、森 和彦、上野盛夫、池田陽子、山崎俊秀、木下 茂. 円蓋部基底繊維柱帯切除術における術後早期眼圧と中期予後の検討. 第36回日本眼科手術学会. 福岡.2013.1.25
29. 森 和彦、池田陽子、上野盛夫、

吉川晴菜、丸山悠子、木下 茂.
Suture trabeculotomy や
Canaloplastyにおけるシュレム管
貫通症例の検討. 第36回日本眼
科手術学会.福岡.2013.1.25

Kageyama M.za Method for
determination of progression
risk of glaucoma. US Patent
No: US2011/02071222522597.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. Kinoshita S., Tashiro K,
Nakano M, Yagi T, Mori K,
Ikeda Y, Taniguchi T, and

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

[Ⅱ]

平成 24 年度 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）

分担研究報告書

高密度チップによる広義原発開放隅角緑内障のゲノムワイド関連解析

分担研究者 田代 啓

京都府立医科大学大学院 医学研究科 ゲノム医科学 教授

研究要旨

2009年に我々は、全ゲノムにわたる50万個の一塩基配列の違い（SNP）を解析するゲノムワイド関連解析（GWAS）を実施し、広義原発開放隅角緑内障（広義POAG）に関連するSNPを報告した。更に、2012年にはこれらのジェノタイプデータと緑内障患者の末梢血中のサイトカイン量とを組み合わせた緑内障統合的分子診断法のプロトタイプを開発し報告した。本研究では、本診断法に用いるジェノタイプデータの精度の向上のために、統計学的検出力を増大させた広義POAGのGWASを新たに実施した。その結果、ヒト染色体9p21.3領域に存在する *CDKN2B-AS1* 上にボンフェローニ補正を超える5個のSNPを同定することに成功した。更に、広義POAGを眼圧が高いHPG群と正常範囲であるNPG群の2群に分けて相関解析を行ったところ、広義POAGで同定された *CDKN2B-AS1* バリエントがNPG群でのみ有意に検出された。本研究により、広義POAGに非常に強い相関を示すSNPかつHPG群とNPG群を識別することが可能なSNPを同定することができたことから、緑内障の統合的分子診断法を確立・実証する上でより精度の高いジェノタイプデータを提供することが可能になったと考えられる。

A. 研究目的

緑内障統合的分子診断法を確立・実証するために、統計学的検出力の高い広義POAGのGWASを新たに実施し、より診断精度の高いジェノタイプデータを取得することを試みる。

B. 研究方法

2005年以来、我々が独自に収集している5,000例を超す臨床検体の中から総計2,126検体を選別し、アフメトリクス社のDNAマイクロアレイ（Genome-Wide Human SNP Array 6.0）を用いて906,600個のSNPのジェノタイプを決定した。次に、緑内障専門医による厳格な診断により広義POAG群833例と対照群686例を選別し、厳格なフィルターにより抽出した653,519個の高精度なジェノタイプデータを用いて相関解析を実施した。更に、眼圧データに基づいて疾患群を眼圧の高い群

（HPG）と低い群（NPG）の2群に分けて相関解析を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究では患者由来の臨床情報とゲノム情報を取り扱うので、関連する倫理と法令を遵守しながら実行する。

C. 研究結果

GWASの結果、ヒト染色体上の9p21.3領域に存在する *CDKN2B-AS1* 上にボンフェローニ補正を超える有意なSNPが集中的に同定された。次に、広義POAG群を眼圧の高いHPG群330例と正常範囲のNPG群503例の2群に分けた相関解析を実施した結果、広義POAGのGWASで検出されたSNPと同一の *CDKN2B-AS1* 上のSNPがNPG群でのみ有意に検出された。

D. 考察

統計学的検出力の高いGWASを新

たに実施したことにより、広義 POAG に非常に強い相関を示す SNP を同定することに成功したことから、緑内障の統合的分子診断法の精度の向上に寄与することが期待される。一方、これらの SNP は NPG 群に特異的であったことから、NPG と HPG を識別することが可能な有用な SNP が同定されたと考えられる。

E. 結論

緑内障統合的分子診断法の確立・実証に寄与し得る精度の高い *CDKN2B-AS1* 上の SNP を同定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishida K, Yagi T, Tanaka M, Tokuda Y, Kamoi K, Hongo F, Kawauchi A, Nakano M, Miki T, and Tashiro K.

Identification of a novel gene by whole human genome tiling array. *Gene* 516: 33-38 2013,

2. 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, and Tashiro K. An approach to predict the risk of glaucoma development by integrating different attribute data. *SpringerPlus* 1: 41 2012,
3. Komori M, Matsuyama Y, Nirasawa T, Thiele H, Becker M, Alexandrov T, Saida T, Tanaka M, Matsuo H, Tomimoto H, Takahashi R, Tashiro K. Ikegawa M, and Kondo T. Proteomic pattern analysis discriminates among multiple sclerosis-related

- disorders. *Ann. Neurol.*, 71: 614-623, 2012.
4. Ishigami N, Tokuda T, Ikegawa M, Komori M, Kasai T, Kondo T, Matsuyama Y, Nirasawa T, Thiele H, Tashiro K, and Nakagawa M. Cerebrospinal fluid proteomic patterns discriminate Parkinson's diseases and multiple system atrophy. *Movement Disorders*, 27: 851-857 2012,
 5. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Omi N, Ueno M, Imai K, Adachi H, Kageyama M, Mori K, Kinoshita S, and Tashiro K. Common variants in *CDKN2B-AS1* associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by genome-wide association studies in Japanese, *PLoS ONE* 7: e33389 2012,
 6. Ueta M, Tamiya G, Tokunaga K, Sotozono C, Ueki M, Sawai H, Inatomi T, Matsuoka T, Akira S, Narumiya S, Tashiro K, and Kinoshita S, Epistatic interaction between Toll-like receptor 3 (TLR3) and prostaglandin E receptor 3 (PTGER3) genes, *J, Allergy Clin, Immunol*, 129: 1413-1416 2012,
- 2, 学会発表
1. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Omi N, Adachi H, Ueno M, Mori K, Kinoshita S, and Tashiro K. Common genetic variants of primary open-angle glaucoma in Japanese population, 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. San Francisco (Nov. 6-10,

- 2012).
2. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Imai K, Nakano M, Fuwa M, Yoshii K, Yagi Y, Tokuda Y, Tashiro K, and Kinoshita S. Association of risk alleles of glaucoma marker SNPs with morphological characters of the optic disc. 10th Congress of the European Glaucoma Society (EGS) Copenhagen Demmark(June.18-22,2012).
 3. Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Imai K, Nakano M, Tokuda Y, Omi N, Adachi H, Tashiro K, and Kinoshita S. Genome-wide association study on primary open-angle glaucoma with a 1000K gene chip. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology Florida (May 6-10 2012),
 4. Maruyama Y, Mori K, Yoshii H, Yoshikawa H, Ikeda Y, Ueno M, Tashiro K, Kinoshita S. Analysis of Hematological and Biochemical Data in Primary Open - Angle Glaucoma Patients. Asia Pacific Glaucoma Congress. Bali,Indonesia (Dec.7-9 2012)
 5. 徳田雄市、田中雅深、石田博、八木知人、三木恒治、田代啓. HECTドメインを有する新規遺伝子の研究. 第85回日本生化学会大会.福岡.2012. 12. 15
 6. 池田陽子、森 和彦、上野盛夫、今井浩二郎、中野正和、徳田雄市、大見奈津江、佐藤隆一、田代啓、木下 茂. CDKN2B-AS1の病型別原発開放隅角緑内障全ゲノム関連