

201317030A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木下 茂

平成26(2014)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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木下 茂

平成26(2014)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	16
	田中 光一	19
	森 和彦	23
	中野 正和	31
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV.	研究成果の刊行物・別刷	41

[I]

25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、5,400例を超える血液検体（細胞株樹立済み）と過去16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、そのデータを基に緑内障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。

本年度は臨床情報をゲノム情報に結びつけて解析しやすい情報管理環境の整備を行い、臨床情報の強化を図った。またこれまで1塩基の違い（SNP）のバリエーションに限定していたゲノム情報について、昨年度に構築した大規模計算用の解析サーバー環境を活用して、新たにコピー数の違いのバリエーション（copy number variant, CNV）情報を取得し、抽出された高精度なコピー数データに基づくゲノムワイド関連解析を実施することによって、広義POAGに関連す

るCNVの同定を試みた。またPOAGの発症に関与することが示唆されているグルタミン酸トランスポーター*SLC1A3*に着目したCNVの解析も進行中である。これらの情報を活用して診断アルゴリズムの判別精度を検証し、良好な成績を得た。

A. 研究目的

本大学附属病院緑内障専門外来にて、緑内障サンプル取得、臨床情報の入力/環境整備をし、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、広義POAGのCNV解析を新たに実施し、抽出された高精度なコピー数データに基づくゲノムワイド関連解析を実施することによって、広義POAGに関連するCNVの同定、さらにグルタミン酸トランスポーター*SLC1A3*に着目した解析も合わせて行い、それらの解析結果から診断アルゴリズムの判別精度を検証した。

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、日々臨床情報が入力されている。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5,400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、統計解析に用いている。それらの臨床情報管理環境を強化・整備する。さらに昨年度に構築した大規模計算用の解析サーバー環境を活用して、新たにコピー数の違いのバリエーション (copy number variant, CNV) 情報を広義POAG群824例および対照

群686例について取得し、抽出された高精度なコピー数データに基づくゲノムワイド関連解析を実施する。CNV解析ではGWAS解析とともにグルタミン酸トランスポーター*SLC1A3*に着目した。これらの情報を活用して診断アルゴリズムの判別精度を検証した。

(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

種々の検定方法を用いたゲノムワイド関連解析の結果、広義POAGに関連することが強く示唆されるボンフェローニ補正を越える有意なCNVが200個以上のプローブから検出された。

緑内障患者群において440例中20例、健常群において450例中2例にグルタミン酸トランスポーター*S*

*SLC1A3*のヘテロ接合の一塩基置換が見出された。またCNVにおいても*SLC1A3*のデータを取得し解析中である。さらにこれらの解析結果からCNVは約500個を診断用候補バリエーションとして選択し、これらのバリエーションを用いて機械学習法による判別を試みた。SNPの解析結果およびCNVを組み合わせることにより正診率の向上が認められた。

D. 考察

長期にわたる臨床データの蓄積とデータ管理環境を整えることが臨床データの質を上げ、今回CNVのデータ解析ができたことで、緑内障統合的診断法の診断アルゴリズムの強化・至適化ができた。

E. 結論

SNP単独あるいはSNPとCNVの組み合わせで緑内障リスクの高い正診率が得られることが明らかになっ

た。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura T, Hamuro J, Takaishi M, Simmons S, Maruyama K, Zaffalon A, Bentley AJ, Kawasaki S, Nagata-Takaoka M, Fullwood NJ, Itami S, Sano S, Ishii M, Barrandon Y, Kinoshita S. Lrig1 controls corneal-stem-cell homeostasis through negative regulation of the Stat3-dependent inflammatory pathway. *J Clin Invest. in press*, 2013.
2. Watanabe A, Kondoh E, Selva D, Imai K, Wakimasu K, Araki B, Kinoshita S. Relationship between frequent swimming pool use and lacrimal duct obstruction. *Acta Ophthalmol. in press*, 2013.
3. Okumura N, Nakano S, Kay EP, Numata R, Ota A, Sowa Y, Sakai T, Ueno M, Kinoshita S, Koizumi N. Involvement of cyclin D and p27 in cell proliferation mediated by ROCK inhibitors (Y-27632 and Y-39983) during wound healing of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci. in press*, 2013.
4. Ueta M, Mizushima K, Naito Y, Narumiya S, Shinomiya K, Kinoshita S. Suppression of polyI:C-inducible gene expression by EP3 in murine conjunctival epithelium. *Immunol Lett. in press*, 2013.
5. Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S. Author response: Human corneal endothelium regeneration: effect of ROCK Inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci. 54: 5594-5595*, 2013
6. Nakahara M, Okumura N, Kay EP, Hagiya M, Imagawa K, Hosoda Y,

- Kinoshita S, Koizumi N. Corneal endothelial expansion promoted by human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium. *PLoS One*. 23: e69009, 2013
7. Uchino M, Yokoi N, Uchino Y, Dogru M, Kawashima M, Komuro A, Sonomura Y, Kato H, Kinoshita S, Schaumberg DA, Tsubota K. Prevalence of dry eye disease and its risk factors in visual display terminal users: the osaka study. *Am J Ophthalmol*. 156: 759-766, 2013.
 8. Kitazawa K, Kawasaki S, Shinomiya K, Aoi K, Matsuda A, Funaki T, Yamasaki K, Nakatsukasa M, Ebihara N, Murakami A, Hamuro J, Kinoshita S. Establishment of a human corneal epithelial cell line lacking the functional TACSTD2 gene as an in vitro model for gelatinous drop-like dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54: 5701-5711, 2013.
 9. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Nakagawa H, Hamuro J, Kinoshita S. Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea*. 32: 1167-1170, 2013.
 10. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S. Rebamipide suppresses PolyI:C-stimulated cytokine production in human conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther*. 29: 688-693. 2013.
 11. Hirata-Tominaga K, Nakamura T, Okumura N, Kawasaki S, Kay EP, Barrandon Y, Koizumi N, Kinoshita S. Corneal endothelial cell fate is maintained by LGR5 through the regulation of

- hedgehog and Wnt pathway. *Stem Cells*. 31: 1396-1407, 2013.
12. Kinoshita S, Oshiden K, Awamura S, Suzuki H, Nakamichi N, Yokoi N; Rebamipide Ophthalmic Suspension Phase 3 Study Group. A randomized, multicenter phase 3 study comparing 2% rebamipide (OPC-12759) with 0.1% sodium hyaluronate in the treatment of dry eye. *Ophthalmology*. 120: 1158-1165, 2013.
 13. Okumura N, Koizumi N, Kay EP, Ueno M, Sakamoto Y, Nakamura S, Hamuro J, Kinoshita S. The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54: 2493-2502. 2013.
 14. Araki-Sasaki K, Hirano K, Osakabe Y, Kuroda M, Kitagawa K, Mishima H, Obata H, Yamada M, Maeda N, Nishida K, Kinoshita S. Classification of secondary corneal amyloidosis and involvement of lactoferrin. *Ophthalmology*. 120: 1166-1172. 2013.
 15. Okumura N, Kay EP, Nakahara M, Hamuro J, Kinoshita S, Koizumi N. Inhibition of TGF- β signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine. *PLoS One*. 8: e5800. 2013.
 16. Sotozono C, Fukuda M, Ohishi M, Yano K, Origasa H, Saiki Y, Shimomura Y, Kinoshita S. Vancomycin Ophthalmic Ointment 1% for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections: a case series. *BMJ Open*. e001206, 2013.
 17. Shinomiya K, Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Yokoi N, Koizumi N,

- Kinoshita S. Immunohistochemical analysis of inflammatory limbal conjunctiva adjacent to Mooren's ulcer. Br J Ophthalmol. 97: 362-366, 2013.
2. 学会発表
 1. 池田陽子、森 和彦、上野盛夫、中野正和、吉井健悟、徳田雄市、大見奈津江、佐藤隆一、田代啓、木下 茂. 正常者におけるCDKN2B-AS1のジェノタイプ別臨床データの解析. 第117回日本眼科学会総会. 東京. 2013.4.4-7.
 2. 吉川晴菜、池田陽子、吉井健悟、森 和彦、上野盛夫、丸山悠子、中野正和、大見奈津江、徳田雄市、田代 啓、木下 茂. 正常眼圧緑内障患者における血液生化学的データの解析. 第117回日本眼科学会総会. 東京. 2013.4.4-7.
 3. 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117回日本眼科学会総会. 東京. 2013.4.4-7.
 4. 丸山悠子、森 和彦、吉川晴菜、上野盛夫、池田陽子、木下 茂. 随意的眼球運動に伴う眼圧変動の解析. 第117回日本眼科学会総会. 東京. 2013.4.4-7.
 5. 石田 学、池田陽子、森 和彦、上野盛夫、丸山悠子、吉川晴菜、木下 茂. 正常健常者における視神経乳頭面積分布の検討. 第67回日本臨床眼科学会. 横浜. 2013.10.31-11.3
 6. 池田陽子、森 和彦、上野盛夫、吉川晴菜、加藤浩晃、丸山悠子、吉井健悟、木下 茂. 正常者前房隅角形状の加齢に伴う変化の検討. 第67回日本臨床眼科学会. 横浜. 2013.10.31-11.3.
 7. 森 和彦、上野盛夫、池田陽子、吉川晴菜、丸山悠子、加藤浩晃、木下 茂. 京滋地区における過去7年間の緑内障薬物処方状況の

- 検討. 第67回日本臨床眼科学会.
横浜. 2013.10.31-11.3.
8. 津崎さつき、池田陽子、森 和彦、上野盛夫、吉川晴菜、丸山悠子、高橋純子、木下 茂. 初回選択的レーザー線維柱帯形成術による眼圧下降効果の病型別検討. 第24回日本緑内障学会. 東京. 2013.9.21-23.
9. 吉川晴菜、池田陽子、森 和彦、上野盛夫、加藤浩晃、吉井健悟、木下 茂. 落屑緑内障と原発開放隅角緑内障患者における加齢性前房隅角形状変化の比較検討. 第24回日本緑内障学会. 東京. 2013.9.21-23.
10. 杉浦晃祐、森 和彦、吉川晴菜、丸山悠子、池田陽子、上野盛夫、小泉範子、木下 茂. 緑内障眼における黄斑部網膜神経節細胞複合体層厚と網膜深層厚の検討. 第24回日本緑内障学会. 東京. 2013.9.21-23.
11. 高橋純子、森 和彦、加藤浩晃、池田陽子、上野盛夫、山村麻里子、木下 茂. 中心視野障害を有する緑内障患者の視野障害程度と読字能の関連性の検討. 第24回日本緑内障学会. 東京. 2013.9.21-23.
12. 池田陽子、森 和彦、上野盛夫、吉川晴菜、加藤浩晃、丸山悠子、吉井健悟、中野正和、田代 啓、木下 茂. 落屑緑内障患者における血液生化学的データの解析. 第24回日本緑内障学会. 東京. 2013.9.21-23.
13. 大見奈津江、徳田雄市、池田陽子、森 和彦、上野盛夫、佐藤龍一、中野正和、木下 茂. 緑内障研究資源を安定的に確保するための微量血液からの細胞株樹立法の確立. 第24回日本緑内障学会. 東京. 2013.9.21-23.
シンポジウム
14. 森 和彦、池田陽子、上野盛夫、吉川晴菜、丸山悠子、木下 茂. 虹彩角膜内皮症候群に対するエ

クスプレスフィルトレーション
デバイスを用いた濾過手術. 第
37回日本眼科手術学会. 京都.
2014.1.17-19.

15. 池田陽子、森 和彦、上野盛夫、
吉川晴菜、丸山悠子、木下 茂、
線維柱帯切除術後のプロスタグ
ランジン製剤点眼中止に伴う中
心角膜厚変化の検討. 第37回日
本眼科手術学会. 京都.
2014.1.17-19.

- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

Kinoshita S, Tashiro K,

Nakano M, Yagi T, Mori K, Ikeda
Y, Taniguchi T, and Kageyama
M. Method for determination of
progression risk of glaucoma. US
Patent No:
US2011/02071222522597.

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

[Ⅱ]

25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

コピー数バリエーション情報に基づく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

我々は、広義原発開放隅角緑内障（広義POAG）に関連する塩基配列の違い（バリエーション）のゲノム情報と末梢血中のサイトカイン量や白血球のmRNA発現量の測定値とを組み合わせた緑内障統合的分子診断法の確立を目指している。本年度は、これまで1塩基の違い（SNP）のバリエーションに限定していたゲノム情報について、昨年度に構築した大規模計算用の解析サーバー環境（分担・長崎）を活用して、新たにコピー数の違いのバリエーション（copy number variant, CNV）情報を取得（分担・中野）し、抽出された高精度なコピー数データに基づくゲノムワイド関連解析を実施することによって、広義POAGに関連するCNVの同定を試みた。

広義POAG群824例および対照群686例について、全ゲノムにわたるコピー数の増減を複数の検定手法により検討した結果、広義POAGに関連することが示唆される有意なCNVが200個以上のプローブから検出された。これらのプローブは、ゲノム上の約50領域にも及び、数十個の遺伝子にまたがっていることが判明した。本研究を実施したことにより、SNPと共に緑内障統合的分子診断法

の診断アルゴリズムに活用されることが期待される多数のCNV候補を取得することができた。

A. 研究目的

広義POAGに関連するCNVを同定するためのゲノムワイド関連解析を実施し、SNPと共に緑内障統合的分子診断法の診断アルゴリズムに活用可能なCNV情報を取得する。

B. 研究方法

広義POAG群824例および対照群686例について取得した全ゲノムにわたる0から4までのコピー数データ（分担・中野）に基づき、ウィルコクソンの符号順位検定（コピー数の増減数による有意差検定）およびフィッシャーの正確確率検定（コピー数の増減数、増減、増または減による有意差検定）を用いて広義POAGに関連するCNVの検出を試みた。

（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

種々の検定方法を用いたゲノムワイド関連解析の結果、広義POAGに関連することが強く示唆されるボンフェローニ補正を越える有意なCNVが200個以上のプローブから検出された。更に、これらのプローブの染色体における位置情報を解析した結果、同定されたCNVはゲノム上の約50領域にも及び、数十個の遺伝子にまたがっていることが明らかになった。

D. 考察

広義POAGに関連する多数のCNV候補を取得することができたことから、SNPと共に緑内障統合的分子診断法の診断アルゴリズムに活用され

ることが期待される。更に、今後本研究で同定されたCNVの再現性が取得できれば、これらのCNVを端緒とした広義POAGの発症機序を解明する基礎研究が進展することが期待される。

E. 結論

緑内障統合的分子診断法の診断アルゴリズムに活用されることが期待される多数のCNV候補を取得することができた。

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, Tashiro K. Identification of a novel gene by whole human

genome tiling array. *Gene*, 516: 33-38, 2013.

2. 学会発表

1. Li Z, Khor CC, Ikeda Y, Jia L, Chen LJ, Nakano M, George R, Do T, Abu-Amero, K, Tajudin LS, Kee C, Mineo O, Takanori M, Zhang M, Jonas JB, Chau T N, Fuse N, Wong TY, Liu JJ, Garway-Heath DF, Simmons CP, Vijaya L, Kinoshita S, Pang CP, Wang NL, Allingham RR, Hauser MA, Tashiro K, Aung T, Vithana EN. Exome-wide association study for the identification of genes for primary open angle glaucoma (POAG) 63rd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Boston (Oct. 22-26, 2013).

2. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Imai K, Omi N, Adachi H, Tokuda Y, Nakano M, Tashiro K, Kinoshita S. Analysis of ophthalmic clinical data association for CDKN2B-AS1 genotype in normal subjects Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Seattle (May 5-9, 2013).
3. 徳田雄市, 田中雅深, 八木知人, 田代 啓. SFRP2の欠損によるリンパ球のカルシウム流動への影響, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸 (2013年12月3日-6日).
4. 大見奈津江, 徳田雄市, 池田陽子, 森 和彦, 上野盛夫, 佐藤隆一, 中野正和, 木下茂, 田代 啓. 緑内障研究資源を安定的に確保するための微量血液からの細胞株樹立法の確立 第24回日本緑内障学会, 東京 (2013年9月21日-23日).
5. 池田陽子, 森 和彦, 上野盛夫, 吉川晴菜, 加藤浩晃, 丸山悠子, 吉井健悟, 中野正和, 田代 啓, 木下 茂. 落屑緑内障患者における血液生化学的データの解析 第24回日本緑内障学会, 東京 (2013年9月21日-23日).
6. 足立博子, 富永洋之, 丸山悠子, 米田一仁, 丸山和一, 木下茂, 中野正和, 田代 啓. 出生前後のマウス網膜における網羅的遺伝子発現データを用いた新規血管新生関連遺伝子ネットワークの探索, 第86回日本生化学会大会, 横浜 (2013年9月11日-13日).
7. 徳田雄市, 田中雅深, 石田博万, 八木知人, 三木恒治, 田代 啓. DNAアレイを用いた転写産物解析による2つの遺伝子

- の同定, 第86回日本生化学会大会, 横浜 (2013年9月11日-13日).
8. 足立博子, 富永洋之, 丸山悠子, 米田一仁, 丸山和一, 木下茂, 中野正和, 田代 啓. 発生過程のマウス網膜における定量PCR解析に最適なリファレンス遺伝子の検討, 第60回日本生化学会近畿支部例会, 大阪 (2013年5月18日).
9. 吉川晴菜, 池田陽子, 吉井健悟, 森 和彦, 上野盛夫, 丸山悠子, 中野正和, 大見奈津江, 徳田雄市, 田代 啓, 木下 茂. 正常眼圧緑内障患者における血液生化学的データの解析 第117回日本眼科学会, 東京 (2013年4月4日-7日).
10. 池田陽子, 森 和彦, 上野盛夫, 中野正和, 吉井健悟, 徳田雄市, 大見奈津江, 佐藤隆一, 田代 啓, 木下 茂. 正常者におけるCDKN2B-AS1のジェノタイプ別臨床データの解析 第117回日本眼科学会, 東京 (2013年4月4日-7日).
- H 知的財産権の出願・登録状況
- 1 特許取得
- Kinoshita S., Tashiro K, Nakano M, Yagi T, Mori K, Ikeda Y, Taniguchi T, and Kageyama M. Method for determination of progression risk of glaucoma. US Patent No: US2011/02071222522597.
- 2 実用新案登録
- 該当なし
- 3 その他
- 該当なし

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

緑内障統合的診断アルゴリズムの強化・至適化の検討

分担研究者 長崎 生光

京都府立医科大学大学院 医学研究科 統計学 教授

研究要旨

我々は、広義原発開放隅角緑内障（広義POAG）に関連する塩基配列の違い（バリエント）のゲノム情報と緑内障患者に特有な末梢血中のサイトカイン量や白血球mRNAの発現プロファイル情報を組み合わせた緑内障統合的診断法の実用化に向けて、アルゴリズムの強化・至適化を図っている。昨年度までは、広義POAGに関連する一塩基の違いのバリエント（SNP）情報を用いて統計解析手法や機械学習法の予備検討を実施してきたが、本年度は、昨年度整備した解析サーバーをもとに新たに広義POAGに関連するコピー数の違いのバリエント（copy number variant, CNV）の同定に成功した（分担・田代, 中野）ことから、これらの情報を活用して診断アルゴリズムの判別精度を検証した。

まず、統計学的な有意水準が上位のバリエントから診断候補バリエントを厳選し、次に機械学習法を用いてこれらのバリエントを用いた判別を試み、最終的に10交差検証により判別精度の検証を行った。その結果、SNP単独でも80%以上の高い正診率が得られたが、CNV情報を加味することにより更に正診率の向上が認められた。以上の結果から、広義POAGに関連するSNPとCNVのジェノタイプ情報を効果的に診断アルゴリズムに反映させることによって、緑内障