

201419061A

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木下 茂

平成27(2015)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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木下 茂

平成27(2015)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	15
	長崎 生光	21
	田中 光一	25
	森 和彦	29
	中野 正和	40
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV.	研究成果の刊行物・別刷	53

[I]

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)
総括研究報告書

「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%で、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5,800例を超す血液検体（細胞株樹立済み）と過去20年に渡って蓄積してきた臨床情報（分担・森）を基に、今年度は1塩基の違いのバリエーション

（SNP）に引き続き、コピー数の違いのバリエーション（copy number variant, CNV）に着目し、落屑緑内障（PEG）についてCNV情報に基づくゲノムワイド関連解析を実施した（分担・中野、田代）。さらに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、グルタミン酸トランスポーターSLC1A3の2種類のrareバリエーションを再現したマウスの網膜の解析と、その活性化化合物を同定し神経保護効果の検討を行った。

（分担・田中）これらの結果を基に昨年度検討した診断アルゴリズムを用いて、検診チップに搭載するバリエーションの組み合わせを含めたアルゴリズムの確立と検診チップの判別精度を検証した（分担・長崎）。

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、PEG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、PEG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検診チップに搭載するバリエーションの組み合わせを含めたアルゴリズムの確立と検診チップ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5,800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・整備している。さらにこれまで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PEG201例、正常対照697例について取得し、取得した大量のCNVデータについては、独自に構築した専用サーバー (分担・長崎) 上にデータベース化した。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した。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。グルタミン酸

トランスポーターSLC1A3の2種類のrareバリエントを再現したマウスの網膜の解析と、その活性化化合物を同定し神経保護効果の検討を行った。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

落屑緑内障群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250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、検出されたCNVはゲノム上の約30領域から同定され、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。

これらの結果を用いてサポートベクターマシーン (SVM) 応用し、

検診チップに搭載する一塩基の違いのバリエント (SNP) とコピー数の違いのバリエント (copy number variant, CNV) の組み合わせを含めた緑内障統合的診断アルゴリズムを応用した判別率の結果から、PEGでは30SNPと5CNVを検診チップに搭載するバリエントの組合せを決定した。落屑緑内障で判別率81.5% (感度92.5%、特異度69.7%) が認められた。

また緑内障患者群において高頻度で見つかったグルタミン酸取り込み活性を低下させるSLC1A3の2種類のrareバリエント (A169G, A329T) を再現したノックインモデルで作成したマウスの網膜を解析し、A169Gノックインマウスの網膜神経節細胞の数が、野生型より約20%減少していた。網膜におけるSLC1A3 (A169G) の発現は、エクソン4のスキップによるnonsense-mediated mRNA decayにより半分に減少した。また、arundic acidが網膜における

SLC1A3の転写を亢進させ、発現量を増加させることおよびarundic acidを投与することにより、GLASTヘテロマウスの網膜神経節細胞の変性が抑制された。

D. 考察

緑内障発症リスクを判定する検診チップの実用化に向けて、PEGに関連する多数のSNPとCNVの候補バリエーションの中から適切に選択することで、高い判別率を得ることが明らかになった。

またグルタミン酸取り込み活性を低下させるSLC1A3の2種類のrareバリエーション(A169G, A329T)の解析からSLC1A3の発現を増加させるarundic acidが新規緑内障治療薬の候補として考えられた。

E. 結論

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、精力的に本研究を実施したことにより、緑内障

の主要な病型に関連する最適なバリエーションを組み合わせた緑内障統合的分子診断アルゴリズムの確立に成功し、緑内障発症リスクを判定する検診チップの実用化の目処が立った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aung T et al. (Nakano M, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K) A common variant mapping to CACNA1A is associated with susceptibility to exfoliation syndrome. Nat Genet. 2015 Feb 23. doi: 10.1038/ng.3226.
2. Maruyama Y, Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Kinoshita S. Morphological analysis of age-related iridocorneal angle changes in normal and glaucomatous cases using

- anterior segment optical coherence tomography. *Clinical Ophthalmology* 2014;8 1–6
3. Maruyama M, Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Kinoshita S. Effects of Long-Term Topical Prostaglandin Therapy on Central Corneal Thickness. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2014 Apr 16. [Epub ahead of print]
 4. 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.* 2014 Jun 18; 4: 5340. doi: 10.1038/srep05340.
 5. 吉川晴菜、池田陽子、外園千恵、森 和彦、上野盛夫、木下 茂. 先天角膜混濁の超音波生体顕微鏡所見と臨床診断および眼圧の関係 . 日本眼科学会雑誌 119(1):16-21, 2015.
 6. 木下 茂. 【臨床医学の展望 2014】眼科学Ophthalmology 日本医事新報（第4691号）, 2014.
 7. Ueta M, Sawai H, Sotozono C, Hitomi Y, Kaniwa N, Kim MK, Seo KY, Yoon KC, Joo CK, Kannabiran C, Wakamatsu TH, Sangwan V, Rathi V, Basu S, Ozeki T, Mushiroda T, Sugiyama E, Maekawa K, Nakamura R, Aihara M, Matsunaga K, Sekine A, Pereira Gomes JÁ, Hamuro J, Saito Y, Kubo M, Kinoshita S, Tokunaga K. IKZF1, a new susceptibility gene for cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis with severe mucosal involvement. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Jan 27. pii:

- S0091-6749(14)03744-0. doi:
10.1016/j.jaci.2014.12.1916.
[Epub ahead of print]
8. Ueta M, Kannabiran C, Wakamatsu TH, Kim MK, Yoon KC, Seo KY, Joo CK, Sangwan V, Rathi V, Basu S, Shamaila A, Lee HS, Yoon S, Sotozono C, Gomes JÁ, Tokunaga K, Kinoshita S. Trans-ethnic study confirmed independent associations of HLA-A*02:06 and HLA-B*44:03 with cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe ocular surface complications. *Sci Rep*. 2014 Aug 7; 4:5981. doi: 10.1038/srep05981.
 9. Ueta M, Sotozono C, Koga A, Yokoi N, Kinoshita S. Usefulness of a new therapy using rebamipide eyedrops in patients with VKC/AKC refractory to conventional anti-allergic treatments. *Allergol Int*. 2014 Mar; 63(1): 75-81. doi: 10.2332/allergolint.13-OA-0605.
 10. Ueta M, Kaniwa N, Sotozono C, Tokunaga K, Saito Y, Sawai H, Miyadera H, Sugiyama E, Maekawa K, Nakamura R, Nagato M, Aihara M, Matsunaga K, Takahashi Y, Furuya H, Muramatsu M, Ikezawa Z, Kinoshita S. Independent strong association of HLA-A*02:06 and HLA-B*44:03 with cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe mucosal involvement. *Sci Rep*. 2014 Apr 30; 4:4862. doi: 10.1038/srep04862.
 11. Isogai H, Miyadera H, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Tokunaga K, Hirayama N. In

- Silico Risk Assessment of HLA-A*02:06-Associated Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis Caused by Cold Medicine Ingredients. *J Toxicol.* 2013; 2013:514068. doi: 10.1155/2013/514068. Epub 2013 Oct 12
12. Kaniwa N, Sugiyama E, Saito Y, Kurose K, Maekawa K, Hasegawa R, Furuya H, Ikeda H, Takahashi Y, Muramatsu M, Tohkin M, Ozeki T, Mushiroda T, Kubo M, Kamatani N, Abe M, Yagami A, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Ikezawa Z, Matsunaga K, Aihara M. Specific HLA types are associated with antiepileptic drug-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese subjects. *Pharmacogenomics.* 2013 Nov; 14(15): 1821-31. doi: 10.2217/pgs.13.180.
13. 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.* 2014 May-Jun; 159(1-2): 73-5. doi: 10.1016/j.imlet.2013.08.010. Epub 2013 Sep 12.
14. Koudouna E, Young RD, Ueno M, Kinoshita S, Quantock AJ, Knupp C. Three-dimensional architecture of collagen type VI in the human trabecular meshwork. *Mol Vis.* 2014 May 13; 20:638-48. eCollection 2014.
2. 学会発表
1. Yoshikawa H, Ueno M, Nagase M, Ikeda Y, Mori

- K, Hamuro J, Yamamoto Y, Naito Y, Kinoshita S. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma patients as measured by free fatty acids in aqueous humor. SFRRI (Society for Free Radical Research International). Kyoto. 2014.03.24.
2. Yoshikawa H, Ikeda Y, Mori K, Yoshii K, Kinoshita S. Age-Related Change of Anterior Segment Structure in Pseudoexfoliation Glaucoma and Primary Open-Angle Glaucoma. World Ophthalmology Congress. 2014 April.206. Tokyo
 3. Ikeda Y, Takahashi J, Mori K, Ueno M, Kinoshita S. The Efficacy of Switching to Brimonidine Tartrate for the Reduction of Intraocular Pressure. World Ophthalmology Congress. 2014. April. 2-6. Tokyo.
 4. Ueno M, Ikeda M, Mori K, Tashiro K, Kinoshita S. Analysis of Hematological and Biochemical Data in Normal Tension Glaucoma Patients. World Ophthalmology Congress. 2014. April.2-6. Tokyo.
 5. 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. 2014.5.6.
 6. Sannohe C, Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Kinoshita S, Nakano M, Yamada H, Tsuzaki S, Hasegawa S, Yoshii K,

- Comparison of the systemic risk factors, including body mass index, between primary open-angle glaucoma and normal tension glaucoma. ARVO, Orland. 2014.5.4.
7. Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Yoshii K, Kinoshita S. Therapeutic trend analysis of normal tension glaucoma cases in common Japanese clinics over a 7-year period. ARVO, Orland.2014.5.4.
 8. Imai K, Takahashi J, Mori K, Kato H, Ikeda Y, Ueno U, Yamamura M, Kinoshita S. Evaluation of reading speed ability in glaucoma patients with central visual field defects. ARVO, Orland. 2014.5.4.
 9. Maruyama Y, Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Yoshikawa H, Kinoshita S. Comparison study of the intraocular-pressure reduction efficacy and safety between bimatoprost and latanoprost-timolol-fixed combination in Japanese open-angle glaucoma patients who switched from latanoprost. ARVO, Orland.2014.5.4.
 10. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, NakanoM, 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.2014.6.7-11.
 11. Sannohe C, Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Kinoshita S, Nakano M, Yamada H, Tsuzaki S, Hasegawa S, Yoshii K. Comparison of the systemic

- risk factors, including body mass index, between primary open-angle glaucoma and normal tension glaucoma. 11th EGS, Nice.2014.6.7-11.
12. Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Yoshii K, Kinoshita S. Therapeutic trend analysis of normal tension glaucoma cases in common Japanese clinics over a 7-year period. 11th EGS 2014.6.7-11.
13. Kato H, Takahashi J, Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Imai K, Yamamura M, Kinoshita S. Evaluation of reading speed ability in glaucoma patients with central visual field defects. 11th EGS, Nice.2014.6.7-11.
14. Maruyama Y, Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Yoshikawa H, Kinoshita S. Comparison study of the intraocular-pressure reduction efficacy and safety between bimatoprost and latanoprost-timolol-fixed combination in Japanese open-angle glaucoma patients who switched from latanoprost. 11th EGS, Nice.2014.6.7-11.
15. Morikawa K, Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Yoshikawa H, Maruyama Y, Kato H, Yamamoto Y, Kinoshita S. Evaluation of Central Corneal Thickness Recovery Changes Associated with Discontinuance of Prostaglandin Eye-Drop Use Post Trabeculectomy. 11th EGS, Nice. 2014.6.7-11.
16. Yamamoto Y, Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Yoshikawa H, Maruyama Y, Yoshii K, Nakano M, Tashiro K, Kinoshita S. Analysis of Biochemical Markers in

- Pseudoexfoliation Glaucoma Patients. 11th EGS, Nice. 2014.6.7-11.
17. Cho Y, Mori K, Ikeda Y, Ueno M, Yamasaki T, Kinoshita S. 10-year retrospective trend analysis of the characteristics of elderly Japanese glaucoma patients requiring glaucoma surgery. 11th EGS, Nice. 2014.6.7-11.
18. Yamana M, Sugiura K, Mori K, Yoshikawa H, Maruyama Y, Ikeda Y, Koizumi N, Kinoshita S. Examination of Ganglion Cell Complex Thickness and Outer Retinal Layer Thickness in Glaucomatous Eyes. 11th EGS, Nice. 2014.6.7-11.
19. Ikeda Y, Mori K, Ueno M, Imai K, Yoshii K, Sato R, Sato F, Nakano M, Kinoshita S. Evaluation of IOP and Reduction Slopes Over a 16-Year Time Course in Japanese Glaucoma Patients. American Academy of Ophthalmology (AAO). Chicago. 2014.10.20.
20. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Adachi H, Ueno M, Imai K, Sato R, Omi N, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K. Genome-wide association study of exfoliation syndrome/exfoliation glaucoma in a Japanese population. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego Oct. 18-22, 2014.
21. 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総会。京都。2014.1.17-19.
22. 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.
23. 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
角緑内障と正常眼圧緑内障に関
連する全身的要因の検討. 第25
回日本緑内障学会. 大
阪.2014.9.19-21.
24. 張佑子、森和彦、池田陽子、上
野盛夫、山崎俊秀、木下 茂.
当科における過去10年間の高齢
者緑内障手術症例の検討. 第25
回日本緑内障学会. 大阪.
2014.9.19-21.
25. 池田陽子、森和彦、上野盛夫、
今井浩二郎、吉井健悟、佐藤隆
一、佐藤史子、中野正和、田代
啓、山崎俊秀、木下 茂. 広義原
発開放隅角緑内障の過去16年間
の経時的眼圧推移. 第25回日本
緑内障学会. 大阪. 2014.9.19-21
26. 小田莉恵、森和彦、吉井健悟、
池田陽子、上野盛夫、吉川晴菜、
丸山悠子、小泉範子、木下 茂.
日本人健常者における視神経乳
頭サイズと乳頭回転角の検討.
第25回日本緑内障学会. 大阪.
2014.9.19-21.
27. 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. 大阪.
2014.9.19-21.
28. 津崎さつき、池田陽子、森和彦、
上野盛夫、吉川晴菜、丸山悠子、
今井浩二郎、木下 茂. 2種の視
野検査計の信頼性スコアの比較
検討. 第25回日本緑内障学会.
大阪. 2014.9.19-21.

29. 高橋純子、今井浩二郎、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意識化による読字能改善効果の検討. 第25回日本緑内障学会. 大阪. 2014.9.19-21
30. 日野智之、池田陽子、森和彦、上野盛夫、吉川晴菜、丸山悠子、今井浩二郎、木下 茂. 正常者における垂直CD比の分布の検討. 第25回日本緑内障学会. 大阪. 2014.9.19-21.
31. 丸山悠子、池田陽子、森和彦、上野盛夫、吉川晴菜、木下 茂. ラタノプロストからビマトプロストとラタノプロスト/チモロール配合剤への切替え効果. 第25回日本緑内障学会. 大阪. 2014.9.19-21.
32. 荒木やよい、池田陽子、高橋純子、森和彦、上野盛夫、吉川晴菜、丸山悠子、今井浩二郎、木下 茂. 酒石酸ブリモニジンへの変更による眼圧下降効果の検討. 第25回日本緑内障学会. 大阪. 2014.9.19-21.
33. 森千浩、池田陽子、森和彦、中野恵美、津崎さつき、上野盛夫、今井浩二郎、吉川晴菜、丸山悠子、木下 茂. 点眼補助具使用の有無による1日当たり平均点眼使用料の差の検討. 第25回日本緑内障学会. 大阪. 2014.9.19-21.
34. 山本雄士、森和彦、池田陽子、上野盛夫、吉川晴菜、今井浩二郎、木下 茂. トラベクレクトミー術後濾過胞形状に影響を及ぼす要因の検討. 第25回日本緑内障学会. 大阪. 2014.9.19-21.
35. 今井浩二郎、森和彦、稲富勉、池田陽子、上野盛夫、吉川晴菜、丸山悠子、木下 茂. 線維柱帯切除後数年を経て発症した再発性デスメ膜剥離を前眼部OCTにて解析した一例. 第25回日本緑内障学会. 大阪. 2014.9.19-21.

36. 池田陽子、森 和彦、上野盛夫、
今井浩二郎、佐藤隆一、佐藤史
子、吉井健悟、中野正和、木下
茂, 早期結膜濾過胞機能不良に関
連する因子の検討. 第38回手術
学会. 京都. 2015.1.31.

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]

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落屑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、緑内障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。昨年度は、1塩基の違いのバリエーション（SNP）に引き続き、コピー数の違いのバリエーション（copy number variant, CNV）に着目し、我々が独自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、広義原発開放隅角緑内障（広義POAG）についてCNV情報に基づくゲノムワイド関連解析を実施した（分担・中野、田代）。本年度は、緑内障のもう1つの主要な病型である落屑緑内障に関連するCNVの同定を試みた。

落屑緑内障群201例および対照群697例について高精度なCNV情報を取得（分担・中野）した後に、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、落屑緑内障に関連することが示唆される有意なCNVが250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30領域から同定され、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、先行しているSNPと共に緑内障統合的分子診断法の診