

## 論文の内容の要旨

### 論文題目：日本人正常眼圧緑内障の感受性遺伝子の検索

氏名 高本 光子

#### 【背景と目的】

緑内障は、進行性の網膜神経節細胞のアポトーシスを主体とする神経変性疾患であり、障害部位に対応した視野障害を生じる。世界の失明原因の主要なものの一つであり、全世界における有病者は6000万人にのぼると推定される。

高い眼内圧（眼圧）は緑内障を生じさせる明らかな要因であり、現在のところ眼圧下降のみが緑内障による視野障害の進行を抑える唯一の確立された治療法であるが、視神経障害を生じるメカニズムの詳細は明らかではない。

緑内障の中で最も一般的な病型は、開放隅角緑内障 primary open-angle glaucoma (POAG) であり、眼圧を2次的に上昇させる臨床所見を認めない原発性の緑内障である。成人発症、眼圧依存性、慢性進行性という特徴を持つ。さらに、POAGの中でも、無治療時眼圧が常に正常値とされる21mmHg以下のものを正常眼圧緑内障(normal-tension glaucoma、NTG)、21mmHgを超えるものを狭義POAGとして分類する。NTGと狭義POAGはPOAGという同一のスペクトラムに分類されるが、両者には様々な臨床的、病理的な違いが報告されており、何らかの病因論的な違いが存在する可能性がある。さらに、NTGの狭義POAGに対する比率は、欧米人及びアフリカ系アメリカ人では1.0前後、韓国人では3、日本人では10以上と人種差が認められる。NTGの有病率そのものも、欧米人では1%以下に対し日本人では3.6%と日本人で高く、人種的地域的な背景の違いがNTG発症に関わっていると考えられる。

POAGは家族集積性が認められ、同胞再発危険率は2.32~4.37と報告されている。常染色体優性遺伝のNTG家系を対象に行われた解析で10番染色体上の*optineurin*(*OPTN*)がNTGの原因遺伝子として同定された。ただし、*optineurin*の変異は非常に稀である。候補遺伝子アプローチでは*apolipoprotein E* (*APOE*)、*OPA1*、*toll-like receptor 4*(*TLR4*)とNTGの関連が報告されている。ただし、結果が一貫していないものやサンプルサイズが非常に小さいものもあり課題も残る。近年、日本人NTGを対象にゲノムワイド関連解析 genome-wide association study (GWAS) が行われ、2番染色

体の *SI RNA binding domain (SRBD1)* 遺伝子の rs3213787 が NTG との関連を報告されている。

我々は、NTG の有病率の高い日本において、NTG 感受性遺伝子座を同定すべく GWAS を行った。

## 【結果】

### 1. 1 次スクリーニング、2 次スクリーニング、及び replication study

1 次スクリーニング、2 次スクリーニング、及び replication study の流れを図 1 に示す。

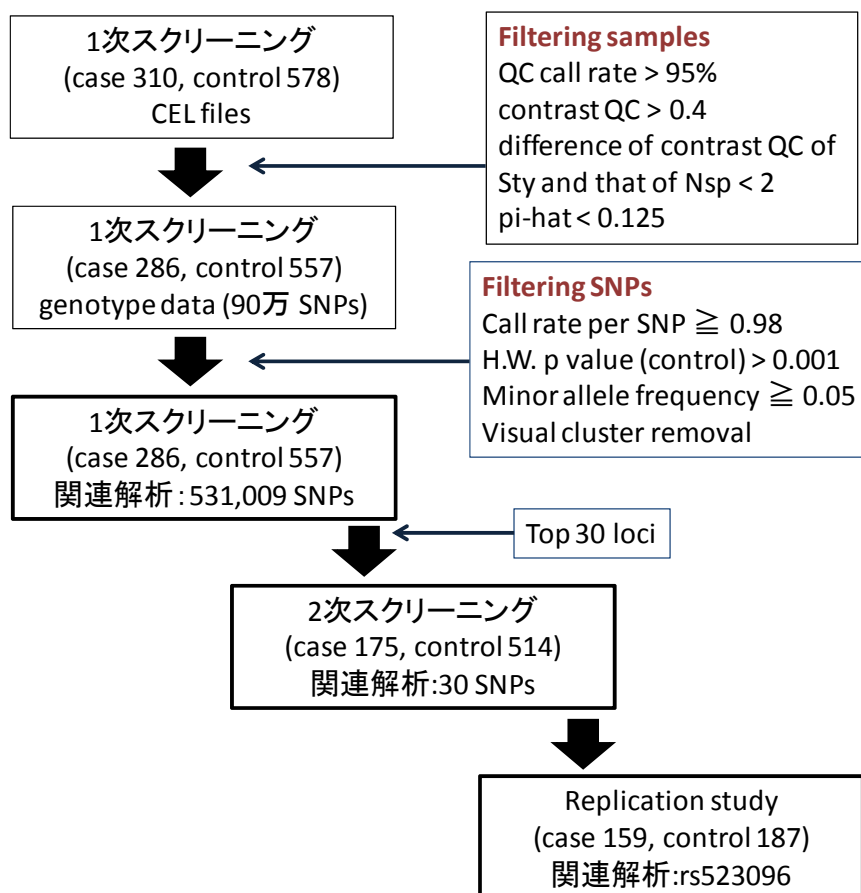


図 1 1 次スクリーニングから Replication study までの流れ

1 次スクリーニングでは、約 90 万か所の SNP をタイピング可能な Affymetrix genome-wide human SNP array 6.0 を用いた。厳格な quality control(QC) のための基準を通過した患者群 286 検体、コントロール群 557 検体、531,009 か所の SNP を対象とし、各 SNP の Cochran-Armitage trend test を実施した。genomic inflation factor ( $\lambda$ )は 1.047 であり、集団の構造化はないと判断した。1 次スクリーニング単独では GWAS としての有意水準( $p = 9.416 \times 10^{-8}$ 、ボンフェローニ法による)を満たす SNP は認められなかった。

2 次スクリーニングでは、1 次スクリーニングとは独立した患者群 175 検体、コントロール群 514 検体を用い、1 次スクリーニングで低い p 値が得られた遺伝子座 30 領域の 30SNPs を対象に

解析を行った。9 番染色体の p21 領域に存在する rs523096 において、NTG との有意な関連を得た ( $p = 5.49 \times 10^{-4}$ , OR = 2.17 (95% confidence interval (CI) 1.39-3.41))。1 次スクリーニングと 2 次スクリーニングを合わせた結果、この SNP は GWAS の有意水準を満たした (combined  $p = 5.16 \times 10^{-8}$ , OR = 2.06 (95% CI 1.58-2.68))。

rs523096 をさらに独立のセット (患者群 159 検体、コントロール群 187 検体) を用いて replication study を行ったところ、1 次及び 2 次スクリーニングの結果を再現した ( $p = 1.19 \times 10^{-4}$ )。最終的に、3 つの患者・コントロールセットを合わせると、 $p = 1.82 \times 10^{-11}$  であった (表 1)。

表 1. 各 stage における rs523096 の関連解析の結果

	Raf	P-value	OR (95% CI)	
	Control/Case			
<b>1st screening</b>	0.825/0.904	$7.57 \times 10^{-6}$	2.10 (1.51-2.93)	
<b>2nd screening</b>	0.859/0.929	$5.49 \times 10^{-4}$	2.17 (1.39-3.41)	<b><math>P_{combined}^a = 5.16 \times 10^{-8}</math></b>
<b>Replication</b>	0.840/0.934	$1.19 \times 10^{-4}$	2.80 (1.64-4.79)	<b><math>P_{combined}^b = 1.82 \times 10^{-11}</math></b>

a: 1 次及び 2 次スクリーニングの combined p、b: 3 つの患者・対照群の combined p

raf: risk allele frequency, OR: odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval.

## 9 番染色体 p21 領域の dense association mapping

1 次スクリーニングで関連を認めた強い連鎖不平衡領域を含む 87 kbp の領域の 29 SNP を 2 次スクリーニングのサンプルセットを用いて解析した。このうち、最も低い p 値を得たのは、rs643319 ( $p = 6.91 \times 10^{-5}$ ) であった。rs523096、rs643319 と強い連鎖不平衡にある複数の SNP が同程度に NTG との強い関連を示した。imputation analysis では、rs523096 や rs643319 の p 値を大きく下回る SNP は同定されなかった。

### 【考察】

本研究では、9 番染色体 p21 領域の遺伝子 CDKN2B の 10kbp 上流かつ CDKN2BAS のイントロンでもある場所に位置する SNP である rs523096 と日本人 NTG の有意な関連を示した。

さらに我々は、同領域の dense association mapping を行った。スクリーニングで有意な関連を示した rs523096 と強い連鎖不平衡にある複数の SNP で強い関連が再現されたが、imputation analysis やハプロタイプ解析の結果を含めても、関連解析では本領域の責任 SNP として一つの SNP に絞ることはできなかった。この領域は、近年、欧米人 POAG および健常人の視神経乳頭の形状

(vertical cup to disc ratio, VCDR) と関連のある領域として報告された領域である。我々の見いだした SNP は、POAG 及び VCDR との関連が示されている SNP と比較し、より強い NTG との関連を示した。さらに、rs523096 のリスクアレルは日本人において頻度が高く、欧米人ではより低いことが知られており (アレル頻度 : 0.907 (JPT)、0.551(CEU)、HapMap data)、日本人における NTG の有病率が高いことの説明の一つになる可能性がある。

今回関連を認めた領域には、*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*、*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (CDKN2B)*、タンパクをコードしない *CDKN2B antisense RNA 1(CDKN2BAS)*、または *ANRIL* が存在する。*CDKN2A*、*2B* にコードされている p16<sup>INK4a</sup> と p15<sup>INK4b</sup> は癌抑制遺伝子として良く知られている。*CDKN2B* の発現は、transforming growth factor beta (TGF-β)により劇的に誘導されることも知られおり、TGF-β 誘導増殖抑制作用に *CDKN2B* が関わっている可能性もある。TGF-β は網膜や視神経の発達及び、緑内障との関連も示唆されている。実際、今回関連の示された領域には、TGF-β 関連タンパク (Smad, sp1, miz-1 and myc) の結合する制御領域がある。*CDKN2A* にコードされている p16<sup>INK4a</sup> と p14<sup>ARF</sup> は、Rb 経路や p53 経路を制御し、細胞周期の進行の阻止、アポトーシス、老化を誘導する。これらの経路は、網膜神経節細胞のアポトーシスにも関わっている。*CDKN2BAS* は巨大な non-coding gene で、機能の詳細は不明だが、*CDKN2BAS* によって近傍の *CDKN2B* や *CDKN2A* の発現量に変化をもたらす可能性がいくつか報告されている。

我々は、9 番染色体 21 領域と NTG との関連を見いだした。疾患の発症に実際に関わっている遺伝子多型を同定し、緑内障性視神経障害の病態にどのように関わっているかを明らかにするためには、機能解析を含めたさらなる検討が必要であると考えられた。