

平成30年 5月22日現在

機関番号：84503

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07505

研究課題名（和文）網膜色素変性におけるEYSの役割

研究課題名（英文）Roles of EYS in retinitis pigmentosa

研究代表者

前田 亜希子（Maeda, Akiko）

公益財団法人先端医療振興財団・その他部局等・講師

研究者番号：40776423

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：EYS遺伝子に変異をもつ患者は典型的な病態を取り、比較的症状が強いタイプに属する症例が多いことが示唆された。また網膜症の進行が早いことがわかった。新しい遺伝子解析を100余名の患者に実施し、EYSが患者の22%超において原因遺伝子であることが判明した。EYSに対する抗体を作成し、サル網膜において視細胞外節に発現していることを確認した。EYS変異をもつRP患者3名より幹細胞（iPSC）を樹立し、また立体網膜を分化誘導した。現在までの解析においては明らかな網膜症の病態は分化網膜において確認できていない。

研究成果の概要（英文）：Patients with EYS-RP carry nonsense variants at the high rate and they displayed a severe classical type of RP phenotype. Moreover, patients with EYS nonsense variants have more severe RP as compared with patients with missense variants. We performed a new genetic analysis with a panel and more than 22% of subjects were identified as EYS-RP. We developed anti-EYS antibody and carried out western blotting and immunohistochemistry. EYS expression was detected in bovine retina by western blotting and in the photoreceptor outer segments in monkey retinas. We established iPSC from 3 patients with EYS-RP. These iPSC were differentiated into three-dimensional retinal organoids. Until now, we were not able to detect clear RP phenotype in these retinal organoids.

研究分野：眼科学

キーワード：EYS 網膜色素変性 遺伝子診断 iPSC細胞 遺伝性網膜疾患

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (retinitis pigmentosa; RP) は進行性に網膜視細胞が障害される難治性遺伝性神経変性疾患である。現在までに 200 を超える原因遺伝子が報告されている。当施設における網膜変性患者 349 人を対象とした 42 遺伝子 736 exons の遺伝子解析の結果、82 人 (23.5%) に eyes shut homolog (EYS) 変異が検出され、EYS が本邦における RP に重要な役割を担い、c.4957_4958insA (p.S1653Kfs*2) (検出頻度 26.8%) と c.8868C>A (p.Y2956*) (検出頻度 13.4%) のふたつの変異が高頻度に検出され、日本人に特徴的な変異であることが他の報告と同様に確認された (Arai Y et al, 2015, J Ophthalmol.)。

常染色体劣性遺伝を呈する RP (autosomal recessive RP: arRP) 患者の原因遺伝子として知られていた RP25 遺伝子が EYS であることが 2008 年にスペイン人家系で同定され、arRP における EYS 変異はヨーロッパ系、アジア系の家系でも広く報告されている。しかしながらその頻度は人種間で違いがあり、ヨーロッパ系では arRP の 5% 程度を占めるのに対し、当施設を含めた本邦での検討では日本人 RP 患者の 10 - 30% と高頻度で検出されており、日本人における RP の主要な原因であることが明らかになってきている (2015, Iwanami M et al, 2012, IOVS., Hosono K et al, 2012, PLoS One., Oishi M et al, 2015, IOVS)。

EYS は網膜視細胞外節に存在し視細胞の構造維持に関与することが示唆されている。EYS は 6q12 染色体上の 46 exons からなる 1987246 塩基、3165 アミノ酸から構成されている。RP の原因遺伝子であることが広く報告されているものの、げっ歯類は EYS を持たず、EYS 遺伝子改変マウスを用いた研究は不可能である。さらに EYS における基礎研究は非常に限られており、網膜における

機能・役割についてはほとんど知られていない。

2. 研究の目的

眼科診療・患者ケア向上と治療法開発を目指し、本邦に頻度が高く特異的であるふたつの EYS 遺伝子変異 c.4957_4958insA (p.S1653Kfs*2) と c.8868C>A (p.Y2956*) が網膜に及ぼす影響を臨床研究、また患者由来 induced pluripotent stem cells (iPSC) からの立体網膜 (3D 網膜) の分化誘導・培養を用いた疾患モデリングを含めた cutting-edge 手法を用いた基礎研究により明らかにする。

3. 研究の方法

検討 1 . 遺伝子診断により EYS 変異が検出された RP 患者 82 人を含む RP 患者の臨床所見をまとめ、c.4957_4958insA、c.8868C>A、他の EYS 変異の症状特性について検討する。

検討 2 . 正常網膜、EYS 正常配列をもつ網膜における EYS の網膜内における発現、局在について検討する。

検討 3 . 遺伝子変異により EYS の網膜内における発現量、分布に変化が観察されるか検討する。

検討 4 . c.4957_4958insA、c.8868C>A 変異を含む EYS 変異を持つ RP 患者末梢血より iPSC を樹立し、さらに立体網膜 (3D 網膜) を分化誘導し、その成熟過程を観察することにより RP の病態を再現可能か検討する。

検討 5 . Embryonic stem cells (ES 細胞) に CRISPR/Cas9 法により本邦に頻度が高く特異的である c.4957_4958insA または c.8868C>A 変異を挿入し、3D 網膜を分化誘導し、その成熟過程を観察する。

4. 研究成果

検討 1 . c.4957_4958insA と c.8868C>A 変異を有する RP 患者に特徴的な臨床所見がみられるか?

(1) 当施設での遺伝子診断により EYS 変異が検出された RP 患者 82 人と本研究期間中

にEYS変異が検出されたRP患者の臨床所見を c.4957_4958insA または c.8868C>A 変異を有するRP患者とそれ以外EYS変異を有するRP患者についてそれぞれまとめ、genotype-phenotype correlation の検討を行った。特に、EYS c.4957_4958insA (p.S1653Kfs*2)と c.8868C>A (p.Y2956*)変異をもつRP患者14名の前向きコホート研究を行った。この結果、EYS-RP患者は典型RPの臨床症状を示し、ナンセンス変異を持つ患者はミスセンス変異を持つ患者に比較し、より網膜症の進行が早い経過をとることがわかった。c.4957_4958insA を含む特定な変異を持つ患者においても、他のナンセンス変異をもつ患者においても、臨床症状には違いは見られなかった。同様な傾向が、前向きコホート研究においても観察された。

(2) 遺伝子診断には新たにパネル解析を用い、EYS全46 exonsのNext Generation Sequence解析を行った。この方法は遺伝子変化の検出率も高く、日本人RPの遺伝子診断に有効な方法であることが明らかになった(論文発表)。

検討2 .正常網膜、EYS正常配列をもつ網膜におけるEYSの網膜内における発現、局在について

(1) ヒト、サルにおけるEYS共通配列かつコンピューター解析で免疫原性の高い3配

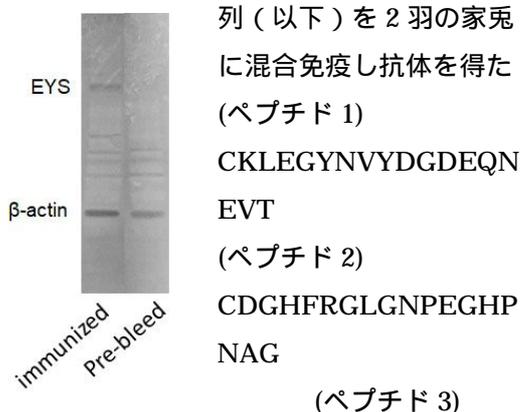


図1. ウェスタンブロットにてEYSが認識された。

(2) サル網膜を用い、ウェスタンブロット(図1)、免疫組織染色を行い、網膜視細胞内節、外節にEYSタンパク質の発現を確認した(図2)。

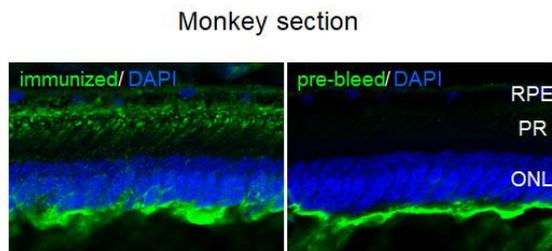


図2. サル網膜においてEYS発現が網膜視細胞内節、外節に見られた。

検討3 .遺伝子変異によりEYSの網膜内における発現量、分布に変化が観察されるか?

c.4957_4958insA変異をもつRP患者3名よりiPSCを樹立し(図3)、3D網膜を分化誘導した。網膜への分化、成熟は健常人より樹立したiPSCを用いた場合と比較して、特に違いは見られなかった。今後はより詳細な検討を行う予定である。

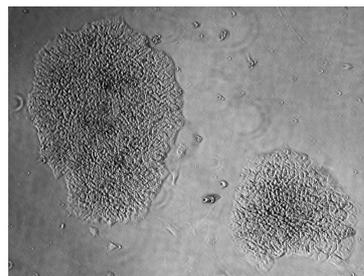


図3. EYS-RP患者よりiPSCを樹立。

検討4 .EYS変異を持つRP患者由来細胞からRPの病態を再現可能か?



図4. 患者由来iPSC-3D網膜を分化した。形態学的には正常であった。

上述の検討3より得たiPSC-3D網膜の形態を分化後60日、90

日、120日、150日において、機能を150日において検

討したが、とくに健常人サンプルより分化した網膜と明らかな違いは認めなかった(図4)。

検討5 . 人為的に EYS 特定変異を正常細胞に挿入することにより RP の病態を再現可能か？

健常者 iPSC に CRISPR/Cas9 法により本邦に頻度が高く特異的である c.4957_4958insA 変異を挿入し、3D 網膜を分化誘導し、その分化、成熟の過程を観察中である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Maeda A, Yoshida A, Kawai k, Arai Y, Akiba R, Inaba A, Takagi S, Fujiki R, Hirami y, Kurimoto Y, Ohara O, Takahashi M. Development of a molecular diagnostic test for retinitis pigmentosa in the Japanese population. Jpn J Ophthalmol. in press

〔学会発表〕(計 2 件)

遺伝性網膜疾患に対するパネル解析を用いた遺伝子診断の実施経験

前田亜希子

日本臨床眼科学会 2017

Drug oral administration to treat retinal degeneration

前田亜希子

日本眼科学会 (招待講演) 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

前田 亜希子(Maeda, Akiko)

研究者番号:40776423

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構

その他部局等

講師