

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09929

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析を軸にした網膜色素変性の病態解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Comprehensive genetic screening and establishment of novel therapeutic method in retinitis pigmentosa

研究代表者

大石 明生(Oishi, Akio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：50572955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性患者に対し網羅的遺伝子解析を行うことで多数の症例で原因遺伝子を同定すること、また特定の遺伝子変異を持つ患者さんからiPS細胞を樹立し、治療法を検討することを目的に研究を行った。その結果、新たに98人の患者さんで原因となる遺伝子バリエーションを特定し、本邦ではEYS遺伝子が原因として多いことを確認した。いくつかの遺伝子について、検査所見や進行速度について結果を報告した。また環境因子、特に喫煙歴や光照射が網膜障害に影響していることを見出した。iPS細胞に対しCRXとNEUROD1を導入することで効率よく視細胞様に分化させられることを見出しこれを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性には多くの原因遺伝子があり、その頻度には人種間での差も大きい。日本で特に多い遺伝子、およびバリエーションを特定することは、今後治療法を考えるうえでより多くの方を対象と出来るようになるための基礎的な情報となる。また現時点で確立した治療方法のないこの疾患について、喫煙が網膜変性を進行させる可能性を示したことは、禁煙というすぐにも実行可能な介入を勧める根拠となる。またiPS細胞から効率的に視細胞様の細胞を分化させる方法は今後iPS細胞を使った研究を行う上で広く応用可能な技術となる。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive genetic screening in Japanese patients with retinitis pigmentosa. We established iPS cells from patients harboring specific variants. We identified causative variants in 98 patients and confirmed that EYS is the major cause of retinitis pigmentosa in Japan. We also reported genotype and phenotype of patients with some specific genes including CYP4V2, PROM1, and PRPH2. We found that environmental factors such as tobacco and light exposure may affect retinal degeneration. We established a new method to generate photoreceptor like cells from iPS cells, which consists of induction of CRX and NEUROD1.

研究分野：医学・眼科学

キーワード：網膜色素変性 遺伝子検査 遺伝型表現型解析 環境因子 分化誘導

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性は遺伝性、進行性に視細胞が障害される疾患で、本邦での視覚障害の原因の第二位を占める重要な疾患である。本疾患の治療に関しては様々な方法が検討されており、特に研究開始当初特定の原因遺伝子に対し遺伝子治療の成功が報告されていた (Russel et al. Lancet 2017)。一方で原因遺伝子を区別せずに行った臨床試験では ciliary neurotrophic factor のように期待されたものでも、明確な効果が示されておらず、(Birch et al. Am J Ophthalmol 2014) 個々の原因遺伝子/変異に応じた治療法を検討すべきであることが示唆される。一方本疾患には数多くの原因遺伝子が報告されており、それぞれに対し、個別に遺伝子治療をデザインするという事は容易ではない。また遺伝子によってはサイズが大きすぎてベクターの作成自体が難しい場合や、dominant negative の変異では正常な遺伝子を補うだけでなく、異常なタンパクを取り除く方法を講じなければならないなど限界がある。

2. 研究の目的

このように多数の原因遺伝子がある疾患の治療を考えるため、我々は次世代シーケンサを用いた遺伝子診断を行うことと、その結果原因遺伝子が特定出来た症例から疾患特異的 iPS 細胞を作成すること、その細胞を用いて stop codon read through と呼ばれる機序に注目した治療法を開発することを目的に研究を開始した。また研究開始当初、これまで報告のない遺伝子である *MRPL19* にホモ接合性にバリエーションを持つ症例を発見していたことから、この遺伝子の病原性を評価することも目的の一つであった。さらに人工知能を用いて新規の原因遺伝子を同定することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 網膜色素変性患者さんの末梢血から採取した DNA に対し、次世代シーケンサを用いた全ゲノム解析を行い、これまで報告のある遺伝子の中で疾患原因となるバリエーションを同定する。

(2) 上記の方法で遺伝子診断がつかなかった症例のもつバリエーションの中から、過去の文献データで学習させた人工知能を用いて原因となりうる未知の遺伝子のスクリーニングを行う。

(3) Crisper-Cas9 報を用いて *MRPL19* 遺伝子をノックアウトしたゼブラフィッシュを作成し、その網膜での表現型を確認する。

(4) *EYS* 遺伝子に premature termination codon をもつ症例から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、視細胞様細胞に分化誘導し、表現型を確認したうえで、PTC124 など stop codon read through の作用を持つ薬剤の効果を検証する。

4. 研究成果

(1) これまで原因遺伝子が特定できていなかった 220 人の網膜色素変性患者に対して、全ゲノムシーケンスによる遺伝子解析を行った。結果 118 人 (53.6%) で原因となるバリエーションを特定することが出来た。原因として最多であったのは *EYS* で *USH2A*, *RPGR* と続く結果であった。見つかった変異の種類は 95 であったが、その中に本研究で注目している premature termination codon を生じる変異は 13 種類 (13.7%) あり、ここに介入するという戦略の治療対象になりうる患者が一定数いることが確認できた。(図 1)

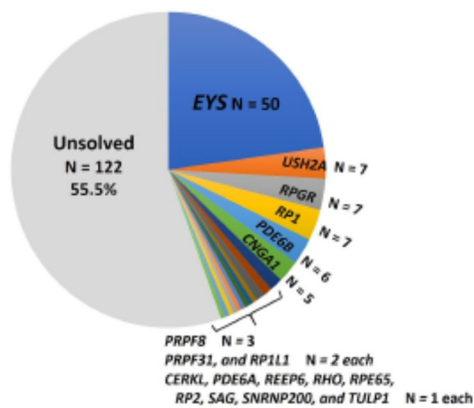


図 1 次世代シーケンサーを用いて解析した本邦の網膜色素変性患者の原因遺伝子の分布 (Numa et al. Sci Rep 2020 より引用)

原因遺伝子が確定した症例のうち、*PROM1*, *PRPH2*, *CYP4V2* など特徴のある表現型を呈する症例について国内外の他施設と連携し、バリエーションと表現型の関連について報告した。

表現型について検討する過程で、環境因子、特に喫煙歴が視力や網膜形態と相関すること (図 2) 光照射も網膜に悪影響を及ぼし得ること、網膜変性でしばしばみられる羞明という症状は網膜色素変性では主に短波長の光で、錐体杆体ジストロフィでは中波長の光でも引き起こされること、網膜色素変性でも黄斑部に変性がある症例では中波長の光の影響が大きくなることなどを見出した。

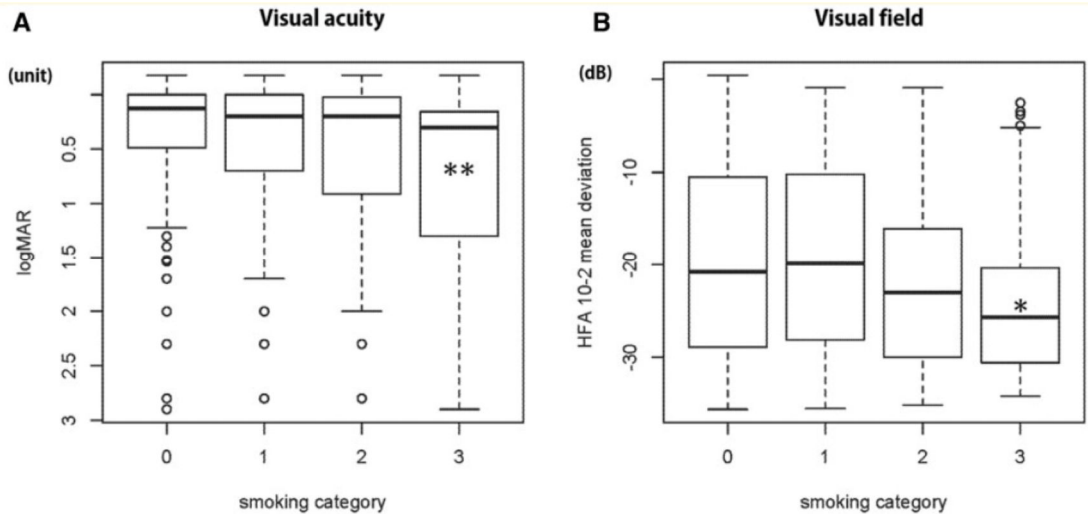


図2 喫煙量を pack×year で定量し、category 0: 喫煙歴なしから category 4: pack×year>30 の4段階に分けて視機能との相関を見たところ喫煙量が多いほど視力も視野も不良であった。(Oishi et al. Brain Commun 2020 より引用)

(2)人工知能を用いた新規原因遺伝子探索については、色々な条件を試したが、設定次第で様々な候補遺伝子が表示される結果となり、また共同研究を行っていた IBM 社の Watson for Drug Discovery 自体も開発中止となったため一旦終了とした。

(3)MRPL19についてはホモ接合のゼブラフィッシュを作成し、受精後6ヵ月まで飼育したが、網膜の表現型は認めず、現時点では網膜色素変性の原因遺伝子ではないだろうという結論に達した。作成したゼブラフィッシュ変異体の凍結精子を National BioResource Project に寄託し一旦終了とした。

(4)iPS細胞を効率よく視細胞様の細胞に分化誘導する手法を確立した。(図3)また他の遺伝子による網膜変性の症例からも iPS 細胞を樹立した。

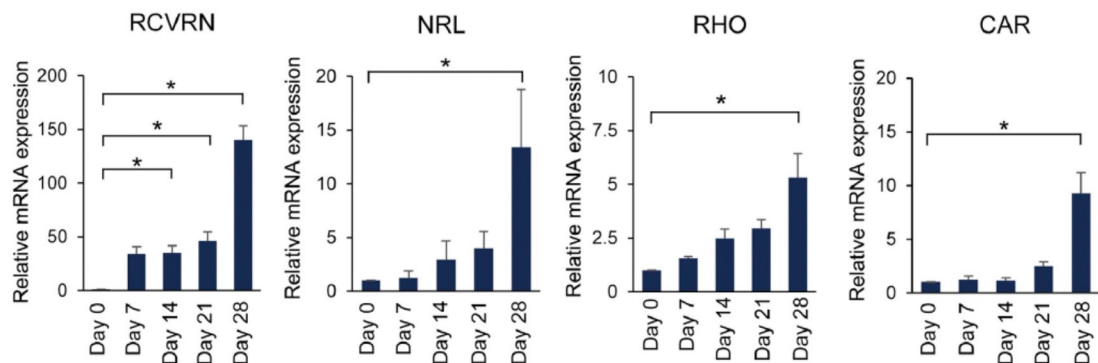


図3 iPS細胞にCRX, NEUROD1 遺伝子を導入することで分化誘導した視細胞様細胞の遺伝子発現。培養28日で視細胞に特異的な遺伝子の発現が有意に上昇している。(Otsuka et al. iScience 2022 より引用)

このように本研究を通して、多くの患者さんの遺伝子診断を確定することが出来、その表現型について、特に PRPH2 や PROM1 といった遺伝子について新たな知見を得た。またこれまであまり顧みられていなかった環境因子の影響についても、表現型に対して一定の影響があることを示すデータを得た。主要な目的の一つであった stop codon readthrough の効果の検証についてはまだ完了していないが、iPS細胞を効率よく視細胞様の細胞に分化誘導する手法を確立したことから、今後の進展が見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Otsuka Yuki, Imamura Keiko, Oishi Akio, Kondo Takayuki, Suga Mika, Yada Yuichiro, Shibukawa Ran, Okanishi Yasue, Sagara Yukako, Tsukita Kayoko, Tsujikawa Akitaka, Inoue Haruhisa	4. 巻 25
2. 論文標題 One-step induction of photoreceptor-like cells from human iPSCs by delivering transcription factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103987 ~ 103987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.103987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Asaoka Ryo, Oishi Akio, Fujino Yuri, Murata Hiroshi, Azuma Keiko, Miyata Manabu, Obata Ryo, Inoue Tatsuya	4. 巻 6
2. 論文標題 Association between the number of visual fields and the accuracy of future prediction in eyes with retinitis pigmentosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMJ Open Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 e000900 ~ e000900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjophth-2021-000900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oishi Akio, Fujinami Kaoru, Mawatari Go, Naoi Nobuhisa, Ikeda Yasuhiro, Ueno Shinji, Kuniyoshi Kazuki, Hayashi Takaaki, Kondo Hiroyuki, Mizota Atsushi, Shinoda Kei, Kusahara Sentaro, Nakamura Makoto, Iwata Takeshi, Tsujikawa Akitaka, Tsunoda Kazushige	4. 巻 12
2. 論文標題 Genetic and Phenotypic Landscape of PRPH2-Associated Retinal Dystrophy in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1817 ~ 1817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12111817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Asano Shotaro, Oishi Akio, Asaoka Ryo, Fujino Yuri, Murata Hiroshi, Azuma Keiko, Miyata Manabu, Obata Ryo, Inoue Tatsuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Detecting Progression of Retinitis Pigmentosa Using the Binomial Pointwise Linear Regression Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 15 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.10.13.15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Tomoko, Oishi Akio, Ikeda Hanako Ohashi, Numa Shogo, Miyata Manabu, Otsuka Yuki, Oishi Maho, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Detection Sensitivity of Retinitis Pigmentosa Progression Using Static Perimetry and Optical Coherence Tomography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 31 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.10.8.31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsuka Yuki, Oishi Akio, Miyata Manabu, Uji Akihito, Oishi Maho, Hasegawa Tomoko, Numa Shogo, Ikeda Hanako Ohashi, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Evaluation of outer nuclear layer overshadowed by retinal vessels in retinitis pigmentosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eye	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41433-021-01578-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omoto Takashi, Oishi Akio, Asaoka Ryo, Fujino Yuri, Murata Hiroshi, Azuma Keiko, Miyata Manabu, Obata Ryo, Inoue Tatsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Development and validation of a visual field cluster in retinitis pigmentosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89233-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakahara Mei, Oishi Akio, Miyata Manabu, Ikeda Hanako Ohashi, Hasegawa Tomoko, Numa Shogo, Otsuka Yuki, Oishi Maho, Matsuda Fumihiko, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical Characteristics, Differential Diagnosis and Genetic Analysis of Concentric Retinitis Pigmentosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 260 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11030260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Y, Koyanagi Y, Fukushima M, Yoshimura M, Fujiwara K, Akiyama M, Momozawa Y, Ueno S, Terasaki H, Oishi A, Miyata M, Ikeda H, Tsujikawa A, Mizobuchi K, Hayashi T, Fujinami K, Tsunoda K, Park JY, Han J, Kim M, Lee CS, Kim SJ, Park TK, Joo K, Woo SJ, Ikeda Y, Sonoda K	4. 巻 5
2. 論文標題 Genotype and Long-term Clinical Course of Bietti Crystalline Dystrophy in Korean and Japanese Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ophthalmology Retina	6. 最初と最後の頁 1269 ~ 1279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oret.2021.02.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kamata Kazuma, Otsuka Yuki, Imamura Keiko, Oishi Akio, Kondo Takayuki, Suga Mika, Shibukawa Ran, Okanishi Yasue, Sagara Yukako, Tsukita Kayko, Yasukawa Tsutomu, Usui Hideaki, Muguruma Keiko, Tsujikawa Akitaka, Inoue Haruhisa	4. 巻 45
2. 論文標題 Generation of a human induced pluripotent stem cell line, BRCi005-A, derived from a Best disease patient with BEST1 mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101782 ~ 101782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101782	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamata Kazuma, Otsuka Yuki, Imamura Keiko, Oishi Akio, Kondo Takayuki, Suga Mika, Shibukawa Ran, Okanishi Yasue, Sagara Yukako, Tsukita Kayko, Yasukawa Tsutomu, Usui Hideaki, Muguruma Keiko, Tsujikawa Akitaka, Inoue Haruhisa	4. 巻 45
2. 論文標題 Generation of a human induced pluripotent stem cell line, BRCi004-A, derived from a patient with age-related macular degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101787 ~ 101787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujinami K, Oishi A, Yang L, Arno G, Pontikos N, Yoshitake K, Fujinami Yokokawa Y, Liu X, Hayashi T, Katagiri S, Mizobuchi K, Mizota A, Shinoda K, Nakamura N, Kurihara T, Tsubota K, Miyake Y, Iwata T, Tsujikawa A, Tsunoda K, Japan Eye Genetics Consortium study group	4. 巻 184
2. 論文標題 Clinical and genetic characteristics of 10 Japanese patients with PROM1 associated retinal disorder: A report of the phenotype spectrum and a literature review in the Japanese population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 656 ~ 674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.c.31826	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Otsuka Yuki, Oishi Akio, Miyata Manabu, Oishi Maho, Hasegawa Tomoko, Numa Shogo, Ikeda Hanako, Ohashi, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Wavelength of light and photophobia in inherited retinal dystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71707-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oishi Akio, Noda Kazunori, Birtel Johannes, Miyake Masahiro, Sato Atsuyasu, Hasegawa Tomoko, Miyata Manabu, Numa Shogo, Charbel Issa Peter, Tsujikawa Akitaka	4. 巻 2
2. 論文標題 Effect of smoking on macular function and retinal structure in retinitis pigmentosa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 fcaa117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/braincomms/fcaa117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大石明生
2. 発表標題 網膜ジストロフィの原因遺伝子と環境因子
3. 学会等名 長崎県眼科医会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石明生
2. 発表標題 網膜ジストロフィの遺伝子と環境因子
3. 学会等名 京大眼科同窓会学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚悠生, 大石明生, 宮田学, 宇治彰人, 大石真秀, 長谷川智子, 沼尚吾, 辻川明孝
2. 発表標題 網膜血管陰影を利用した網膜色素変性患者に対する光障害の影響の検討
3. 学会等名 日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Otsuka Y, Oishi A, Miyata M, Oishi M, Hasegawa T, Numa S, Tsujikawa A
2. 発表標題 Investigating the origin of photophobia in inherited retinal dystrophy
3. 学会等名 EURETINA (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大塚 悠生 (Otsuka Yuki)		
研究協力者	沼 尚吾 (Numa Shogo)		
研究協力者	宮田 学 (Miyata Manabu)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	長谷川 智子 (Hasegawa Tomoko)		
研究協力者	辻川 明孝 (Tsujikawa Akitaka)		
研究協力者	朝岡 亮 (Asaoka Ryo)		
研究協力者	松田 文彦 (Matsuda Fumihiko)		
研究協力者	飯田 敦夫 (Iida Atsuo)		
研究協力者	藤波 芳 (Fujinami Kaoru)		
研究協力者	村上 祐介 (Murakami Yusuke)		
研究協力者	井上 治久 (Inoue Haruhisa)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Oxford University	Moorefield eye hospital		
ドイツ	Bonn University			
韓国	Seoul National University	Yonsei University	Samsung Medical Center	