

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592561

研究課題名(和文) 網膜色素変性患者の遺伝子診断システム構築：基幹施設症例の大規模収集と原因変異解析

研究課題名(英文) Genetic Diagnosis System for Retinitis Pigmentosa Patients: Large-scale collection and mutation analyses of Japanese RP patients

研究代表者

堀田 喜裕 (HOTTA, YOSHIHIRO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：90173608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性(RP)は常染色体優性遺伝(ad)、常染色体劣性遺伝(ar)、X連鎖性遺伝形式が知られ、遺伝的異質性が高い疾患である。我々は、100人の日本人arRPに対しEYSの変異解析を行った。結果、18人の患者から7種の原因変異を同定した。また、残りの82人に対してUSH2Aの変異解析を行い、4人の患者から5種の原因変異を同定した。これらの結果から、日本人arRP患者のEYSとUSH2Aの寄与は22%であり、2つの遺伝子のスクリーニングは日本人RP患者の遺伝子検査や遺伝カウンセリングを行う上で極めて有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa (RP) is a highly heterogeneous genetic disease including autosomal recessive (ar), autosomal dominant (ad), and X-linked inheritance. This study was conducted to determine the spectrum and frequency of EYS mutations in 100 Japanese arRP patients. We detected 7 very likely pathogenic mutations in 18 patients. Of these 100 patients, 82 were included in the next study after 18 RP patients with very likely pathogenic EYS mutations were excluded. The mutation analysis of the USH2A revealed 5 very likely pathogenic mutations in 4 patients. Based on these data, if both EYS and USH2A genes are analyzed among Japanese arRP patients, gene defects could be detected in 22% of the patients in total (18% and 4%, respectively). We believe that screening for these 2 genes is effective for genetic testing and counseling of RP patients in Japan.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜色素変性 遺伝子診断 常染色体劣性 変異解析 EYS USH2A

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (RP) は臨床的にも遺伝的にも異質性の高い疾患であり、臨床的重症度や症状、進行の速さは症例や家系により多彩である。本疾患は、夜盲が初期症状であることが多く、進行すると周辺部視野障害・視力低下へつながり、最終的に失明に至る。

RP は常染色体優性遺伝 (ad)、常染色体劣性遺伝 (ar)、X連鎖性遺伝の3つの遺伝形式をとり、我が国の各遺伝形式の占める割合は、ad が 16.9%、ar が 25.2%、X連鎖性が 1.6%と報告されている。また、家系内に他に患者が見られず遺伝形式が明らかでない孤発例が多く存在している (56.3%)。我が国では以前、近親婚率が諸外国に比べて比較的高かったため arRP の相対頻度が高かったが、近年の近親婚率の低下によりその相対頻度が減少しつつある。また少子化に伴って arRP が孤発例となっている可能性がある。

RP は、本研究開始当時から多くの原因遺伝子が同定されていた。欧米ではこれまでに見つかった原因遺伝子を検討し、adRP の約半数、arRP の約 60% で原因を同定することができると思われていた。将来、本疾患に対して有効な治療法が開発されるためには遺伝子レベルでの病因解明が必要である。

RP 原因遺伝子のスクリーニングは、既に欧米、中国等の多数の施設によって行われていたが、我が国では一部の adRP 患者について変異解析が行われているのみであり、arRP の原因遺伝子の変異解析は諸外国と比べ圧倒的に後れをとっていた。この状況を打開するために、申請者は研究分担者である神戸理化学研究所高橋政代チームリーダー、千葉大学山本修一教授、三重大学近藤峰生教授 (当時、名古屋大学准教授) と共同で arRP 患者を収集し、当時同定されていた 31 個の arRP 原因遺伝子を用いて大規模なスクリーニングを計画した。

2. 研究の目的

我が国の RP 患者を効率よくスクリーニングできる遺伝子診断システムを構築する目的で (1) 4 基幹施設 (浜松医科大学眼科、神戸理化学研究所、名古屋大学医学部眼科、千葉大学医学部眼科) と連携し、できるだけ多くの RP 症例の収集を試みる。(2) 収集した患者 DNA を用いて、当時報告のあった 31 個の arRP 原因遺伝子のうち、USH2A、RPE65 と、候補遺伝子 OPTN のスクリーニングを行う。上記 3 遺伝子に変異が認められなかった場合、他の遺伝子についても他国で遺伝子異常の報告が多い遺伝子から順にスクリーニングを行い、日本人患者に高頻度で認められる原因遺伝子の同定と日本人固有の遺伝子変異を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RP 患者の診断と検体収集

各施設の眼科外来では、倫理規定に基づき遺伝子検査について十分な説明を行い、インフォームドコンセントが得られた患者に対し、詳細な問診 (可能な限り家族歴を詳細に調査する) と眼科的検査 (視力検査、眼底検査、視野検査、網膜電図) を行い、RP の確定診断および遺伝形式の分類を行う。現在は一般に家系が小さく (発端者に同胞がいない)、家系情報がそろわない (祖父母等の情報が無い) ため正確な遺伝形式を判断することが難しいため、4 施設において収集する検体は「発端者の両親が正常の患者 (優性以外の遺伝形式)」という共通の定義を使用して収集する。この定義から収集された検体は、遺伝形式として常染色体劣性と X 連鎖で残りが孤発例である。孤発例の男性患者や男性同胞例の家系では X 連鎖なのか劣性なのか家系図で判断することが困難であるが、これらの患者を除外すると孤発例に潜んだ常染色体劣性の家系を逃してしまう可能性もあるため、本研究では「優性以外の遺伝形式をとる検体」全てを収集し、遺伝子解析の対象とする。

(2) DNA の調製、細胞の株化

確定診断された患者より血液を最大 20ml 採取する。検体は連結可能匿名化し、血液 2ml より DNA を抽出精製する。また 5ml より白血球を分離し EB ウィルスを感染させて B リンパ芽球様細胞株の樹立を行い、常に必要量の高分子量 DNA を調製することができるように準備する。残りの血液はフリーザーに冷凍保存する。

(3) arRP 原因遺伝子の変異検出法の検討

多くの検体に対してエキソン数が多い遺伝子の全エキソンを PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンスすることは時間と労力がかかる。そのため我々は(2)で確立する細胞株での mRNA の発現を検討し、検出出来れば活用する。発現量が実用的でない場合は通常どおり以下に述べる(4)の方法を用いる。

(4) arRP 原因遺伝子の変異検索

(3)が確立できれば活用する。活用できない場合は、通常通り PCR ダイレクトシーケンス法を行う。即ち、末梢血から単離したゲノム DNA を用いて原因遺伝子の各エキソン及びその隣接イントロン領域を独自設計したプライマーで PCR 増幅し、配列を決定する。遺伝子変異を同定できた患者では、家族の検体を利用して分離解析を行うとともに、正常コントロールでの解析、他種生物での相同遺伝子のホモロジー解析を行う。

(5) 遺伝子変異と表現型の検討

遺伝子解析結果をもとに、原因遺伝子の変異部位と臨床症状との関連を検討する。これらデータを蓄積し、我が国の RP 患者における原因遺伝子変異と病態の対応関係の基盤データを作成する。

4. 研究成果

(1)と(2)については 100 人の日本人 arRP 患者を収集でき、全ての患者の血液より DNA を抽出精製した。また可能な限り B リンパ芽球様細胞株の樹立を行った。解析候補遺伝子として *USH2A*, *RPE65*, *OPTN* を挙げ、

USH2A から変異解析を行う計画だったが、本研究開始時に新たに欧州の arRP 家系で *EYS* に変異が検出される頻度が非常に高いと報告があり、予定を変更して *EYS* から変異探索を行うことにした。(3)については樹立した患者 B リンパ芽球様細胞株での *EYS* の発現検討を試みたが、発現は認められなかった。そのため通常通りゲノム DNA を用いて(4)の変異探索を行った。

(4)の結果は以下のとおりであった。

EYS 遺伝子の変異解析の結果、100 人の日本人 arRP 患者において 18 人の患者から 7 種 (c.4957_4958insA, c.8868C>A, c.2522_2523insA, Deletion exon 32, c.6557G>A, c.7793G>A, c.8351T>G)の疾患原因変異を同定した。18 人中 9 人は片側アレルの原因変異のみ同定できた。また上記 18 人の患者以外の 8 人から 6 種のミスセンス変異(c.77G>A, c.2923T>C, c.5404C>T, c.5884A>G, c.8875C>A, c.9272T>C)を同定した。今回同定した 13 種の変異のうち c.6557G>A 以外の 12 種は新規変異であった。c.4957_4958insA は 12 人の患者から、c.8868C>A は 4 人の患者から同定した。これら 2 種類の変異は日本人 arRP 患者において突出して頻度の高い遺伝子変異である可能性が高い(表)。

同様に日本人レーバー先天盲患者 28 人に対して c.4957_4958insA と c.8868C>A のスクリーニングを行ったが、上記 2 変異は見つからなかった。これら解析結果は 2012 年 2 月 17 日に *PLoS ONE* 誌に掲載された。

上記研究成果の報告後も arRP 患者の収集を継続して、更に 106 人の arRP 患者を収集した。新たに収集した arRP 患者に対しては c.4957_4958insA と c.8868C>A の 2 か所のみを PCR ダイレクトシーケンス法で変異解析を行い、arRP 患者 106 人中 15 人に c.4957_4958insA(14%)、5 人に c.8868C>A(5%) 変異を同定した。これまでに解析した arRP 患者を含めると 206 人中 27 人に

c.4957_4958insA(13%)、9人にc.8868C>A(4%)
変異を同定した。これら2種の変異は我が国
のarRP患者の主要な原因変異の可能性が高
いことを改めて確認できた。

Family ID	Nucleotide change	Predicted effect	Domain	Location in gene	Type of change	Reference
Families with very likely pathogenic mutations and both alleles affected						
RP3H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Homozygous	This study
RP48K	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Homozygous	This study
RP54K	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Homozygous	This study
RP44K	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP56K	c.6557G>A	p.G2186E	Laminin G	Exon 32	Heterozygous	<i>Abel El-Aziz et al., 2010 Lama RW et al., 2010 This study</i>
	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Compound Heterozygous	This study
RP87N	c.8351T>G	p.L2784R	Laminin G	Exon 44	Heterozygous	This study
	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP81K	c.7793C>A	p.G2598D	Close to Laminin G	Exon 40	Heterozygous	This study
	c.2522_2523insA	p.Y841X	EGF	Exon 16	Compound Heterozygous	This study
RP21H	c.6557G>A	p.G2186E	Laminin G	Exon 32	Heterozygous	<i>Abel El-Aziz et al., 2010 Lama RW et al., 2010 This study</i>
	deletion exon32	p.D2142_S2191delinsG	Laminin G	Exon 32	Homozygous	This study
RP35K	c.8868C>A	p.Y2956X	EGF	Exon 44	Homozygous	This study
Families with single very likely pathogenic mutations						
RP1H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP6H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP12H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP51K	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP96H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP100N	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP8H	c.8868C>A	p.Y2956X	EGF	Exon 44	Heterozygous	This study
RP29H	c.8868C>A	p.Y2956X	EGF	Exon 44	Heterozygous	This study
RP80K	c.8868C>A	p.Y2956X	EGF	Exon 44	Heterozygous	This study
Families with single possible pathogenic mutations						
RP4H	c.9272T>C	p.I3091T	Laminin G	Exon 44	Heterozygous	This study
RP9H	c.8875C>A	p.L2959M	EGF	Exon 44	Heterozygous	This study
RP49K	c.9272T>C	p.I3091T	Laminin G	Exon 44	Heterozygous	This study
RP53K	c.5884A>G	p.T1962A	Laminin G	Exon 28	Heterozygous	This study
RP55K	c.9272T>C	p.I3091T	Laminin G	Exon 44	Heterozygous	This study
RP74K	c.5404C>T	p.L1802F	Close to Laminin G	Exon 26	Heterozygous	This study
RP79K	c.775G>A	p.R280Q	Close to signal peptide cleavage site	Exon 4	Heterozygous	This study
RP83K	c.2923T>C	p.C975R	EGF	Exon 19	Heterozygous	This study

表 .100 人の日本人 arRP 患者において同定された EYS 遺伝子の原因変異

引き続き EYS から原因変異を同定できた患者以外の arRP 患者 82 名に対して USH2A の変異探索を行った。結果、82 人の日本人 arRP 患者において 4 人から 5 種類(p.G229R, p.E1199del, p.R926C, c.8559-2A>G, c.468-14G>A)の原因変異を同定した。4 人中 1 人は片側アレルの原因変異のみを同定できた。また、上記 4 人の患者以外の 2 人から 2 種のミスセンス変異(p.V2386F, p.S4748F)を同定した。同内容は論文投稿中である。

(5) の結果は以下のとおりであった。

EYS 遺伝子より原因変異を両アレルより同定できた 10 名について個々の臨床像と変異の関連について詳細な検討を行った。結果、EYS 遺伝子異常による RP 患者の臨床像は類似しており、多くの患者は 10-20 代で夜盲を発症し、30 代まで比較的良好な視力を保ち、40-50 代で視機能が低下していることが分か

った。特に c.4957_4958insA 変異をホモ接合体でもつ患者の臨床像は EYS 遺伝子に他の変異を持つ患者と比べて臨床像のばらつきが少なかったことを明らかとした。同内容は *Ophthalmic Genetics* 誌で報告した。

今回の遺伝子解析により、日本人 arRP 患者における EYS 遺伝子の寄与は 18% と大きく、原因変異 c.4957_4958insA と c.8868C>A 変異は我が国の arRP 患者において突出して頻度の高い遺伝子変異である可能性が高いことがわかった。この情報は網膜色素変性疾患を研究する研究者、患者をケアする臨床医にとって重要なデータである。日本人 RP の遺伝形式のうち孤発例を含む ar が最も多く、その内 18% もの原因であることは、全 RP 症例の 14% に EYS 遺伝子の異常が存在することになる。これ程の頻度で見つかるのであれば、通常の遺伝子検査によって十分に検出できる。日本人 RP 患者の早期診断が可能となり、遺伝カウンセリングを行う上で極めて有用な情報となり、創薬による薬物療法に道を開く可能性がある。

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 15 件)

Suto K, Hosono K, Takahashi M, Hirami Y, Arai Y, Nagase Y, Ueno S, Terasaki H, Minoshima S, Kondo M, Hotta Y. Clinical phenotype in ten unrelated Japanese patients with mutations in the EYS gene, *Ophthalmic Genet*, 査読有, 35(1), 2014, 25-34. doi: 10.3109/13816810.2013.768673.

Wang C, Hosono K, Ohtsubo M, Ohishi K, Gao J, Nakanishi N, Hikoya A, Sato M, Hotta Y, Minoshima S. Interaction between optineurin and the bZIP transcription factor NRL, *Cell Biol Int*, 査読有, 38(1), 2014, 16-25. doi: 10.1002/cbin.10174.

Homma K, Okamoto S, Mandai M, Gotoh N, Rajasimha HK, Chang YS, Chen S, Li

W, Cogliati T, Swaroop A, Takahashi M. Developing rods transplanted into the degenerating retina of Crx-knockout mice exhibit neural activity similar to native photoreceptors. *Stem Cells*, 査読有, 31(6), 2013, 1149-1159, doi: 10.1002/stem.1372.

Tawada A, Sugawara T, Ogata K, Hagiwara A, Yamamoto S. Improvement of central retinal sensitivity six months after topical isopropyl unoprostone in patients with retinitis pigmentosa. *Indian J Ophthalmol*. 査読有, 61(3), 2013, 95-99, doi: 10.4103/0301-4738.

Ueno S, Koyasu T, Kominami T, Sakai T, Kondo M, Yasuda S, Terasaki H. Focal cone ERGs of rhodopsin Pro347Leu transgenic rabbits. *Vision Res*. 査読有, 91, 2013, 118-123, doi: 10.1016/j.visres.2013.08.006.

Nojima K, Hosono K, Zhao Y, Toshiba T, Hikoya A, Asai T, Kato M. Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Clinical features of a Japanese case with Bothnia dystrophy. *Ophthalmic Genet*. 査読有, 33(2), 2012, 83-88, doi: 10.3109/13816810.2011.634877.

Jin ZB, Takahashi M. Generation of retinal cells from pluripotent stem cells. *Prog Brain Res*. 査読有, 201, 2012, 171-181, doi: 10.1016/B978-0-444-59544-7.00008-1.

Baba T, Hagiwara A, Sato E, Arai M, Oshitari T, Yamamoto S. Comparison of vitrectomy with brilliant blue G or indocyanine green on retinal microstructure and function of eyes with macular hole. *Ophthalmology*. 査読有, 2012, 119(12), 2609-2615, doi: 10.1016/j.ophtha.2012.06.048.

Hirota R, Kondo M, Ueno S, Sakai T, Koyasu T, Terasaki H. Photoreceptor and post-photoreceptor contributions to photopic ERG a-wave in rhodopsin P347L

transgenic rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有, 53(3), 2012, 1467-1472, doi: 10.1167/iovs.11-9006.

Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hiram Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Two novel mutations in the *EYS* gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. 査読有, 7(2), 2012, e31036, doi: 10.1371/journal.pone.0031036.

Sawada M, Sato M, Hikoya A, Wang C-X, Minoshima S, Azuma N, Hotta Y. A case of aniridia with unilateral Peters anomaly. *J AAPOS*. 査読有, 15(1), 2011, 104-106. doi: 10.1016/j.jaapos.2010.11.006.

Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hiram Y, Iwata T, Takahashi M. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 査読有, 6(2), 2011, e17084, doi: 10.1371/journal.pone.0017084.

Sugawara T, Sato E, Baba T, Hagiwara A, Tawada A, Yamamoto S. Relationship between vision-related quality of life and microperimetry-determined macular sensitivity in patients with retinitis pigmentosa. *Jpn J Ophthalmol*. 査読有, 55, 2011, 643-646, doi: 10.1007/s10384-011-0080-9.

Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. *PLoS One*. 査読有, 6(5), 2011, e19911, doi:

10.1371/journal.pone.0019911.

Kakimoto A, Kamekawa Y, Ito S, Yoshikawa E, Okada H, Nishizawa S, Minoshima S, Ouchi Y. New computer-aided diagnosis of dementia using positron emission tomography: brain regional sensitivity-mapping method. *PLoS One*. 査読有, 6(9), 2011, e25033, doi: 10.1371/journal.pone.0025033.

〔学会発表〕(計3件)

Hotta Y, Hosono K, Suto K, Sato M, Mizuta K, Minoshima S. Three Japanese Cases with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa associated with the *USH2A* Gene Mutation. APVRS, 2013, Nagoya.

Hotta Y, Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Ueno S, Shin JP, Kim IT, Kondo M, Minoshima S. Mutation analysis in *EYS* (Eyes Shut Homolog) among Japanese patients with Retinitis pigmentosa. APAO, 2012, Busan.

Hotta Y, Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Ueno S, Terasaki H, Shin JP, Kim IT, Kondo M, Minoshima S. Mutation Analysis in *EYS* (Eyes Shut Homolog) gene among Japanese and Korean Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. The 12th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium, 2012, Hamamatsu.

〔図書〕(計2件)

堀田喜裕、金原出版、眼科臨時増刊号：眼科診療指針のパラダイムシフト、2014、209-215.

堀田喜裕、中西啓、メディカル葵出版、網膜色素変性と Usher 症候群の遺伝子診断、2011、907-912.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：EYS 遺伝子の変異を検出するためのプライマー、プローブ、マイクロアレイ、及び、

これらを備える検出キット、並びに網膜色素変性症原因遺伝子変異の検査方法、網膜色素変性症への遺伝的感受性の検査方法

発明者：細野克博、堀田喜裕

権利者：浜松医科大学

種類：特許

番号：特願 2010-294236 (特開 2012-139170)

出願年月日：2010年12月28日(2012年7月26日公開)

国内外の別：国内

〔その他〕

新聞、雑誌等による報道

日本人の網膜色素変性症 原因遺伝子を発見 日本経済新聞 平成24年2月2日

目の難病、原因遺伝子特定 日本人患者に高頻度で異常 共同通信 平成24年2月2日

目の難病原因遺伝子を特定 中日新聞 平成24年2月2日

日本人に高頻度、目の難病 浜医大が遺伝子特定 静岡新聞 平成24年2月2日

国立成育医療研究センターと浜松医大、日本人で高頻度で網膜色素変性を起こす原因遺伝子を発見、PLoS ONE 誌で発表 日経バイオテク ONLINE 平成24年2月18日

科学 網膜色素変性症 日本人に多い遺伝子異常判明 朝日新聞 平成24年2月23日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀田 喜裕 (Hotta Yoshihiro)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：90173608

(2) 研究分担者

高橋 政代 (Takahashi Masayo)
独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター網膜再生医療研究チーム・チームリーダー
研究者番号：80252443

近藤 峰生 (Kondo Mineo)
三重大学・医学部・教授
研究者番号：80303642

山本 修一 (Yamamoto Shuichi)
千葉大学・医学部・教授
研究者番号：20230550

藪島 伸生 (Minoshima Shinsei)
浜松医科大学・メディカルフォトリクス研究センター・教授
研究者番号：90181966