

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 4 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462738

研究課題名(和文) 網膜色素変性に対する分子遺伝学的研究

研究課題名(英文) Molecular genetic study for retinitis pigmentosa

研究代表者

林 孝彰 (Hayashi, Takaaki)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10297418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性網膜疾患のなかで最も頻度の高い網膜色素変性は、原因遺伝子が多岐にわたり病因を特定できない現状がある。本研究では、網膜色素変性の病態解明を目標に分子遺伝学的アプローチにより原因遺伝子・病因を特定するなかでいくつか新しい疾患原因を特定し、欧米で報告されている疾患原因とはいくつか異なることを明らかにした。本研究結果は、遺伝カウンセリングなどの診療の質を高めるだけでなく、将来の遺伝子補充療法や再生医療など次世代治療の基盤研究に向け有意義なものになると確信する。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa is the most common inherited retinal dystrophy. Molecular genetic mechanisms of retinitis pigmentosa have not been fully elucidated so far because of a variety of causative genes and their mutations. In this study, we performed molecular genetic analysis to find out causative gene mutations and identified some of new gene mutations, which were different from the mutations reported in Europe and USA. We confirm that our results enable us to perform precise diagnostic approach and genetic counseling, and could be beneficial for promising next-generation treatments such as gene replacement and regenerative medicine therapies.

研究分野：眼科額

キーワード：網膜色素変性 レーベル先天黒内障 分子遺伝学的 次世代シーケンサ 全エクソーム解析 遺伝子変異 脳回状脈絡膜萎縮

#### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性網脈絡膜疾患の中で最も頻度の高い網膜色素変性は、緑内障、糖尿病網膜症に次ぐ失明原因の第3位である。他の疾患と異なり、網膜色素変性に関しては未だ、決定的な治療方法が確立していないのが現状である。また、特定疾患治療研究事業の対象疾患(難病)に位置づけられ、治療法の開発が急務である。現在では、治療法に関して遺伝子治療、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞に関する研究がしのぎを削っている。このような状況下で2008年、*RPE65* 遺伝子変異をもつ Leber 先天盲(網膜色素変性類縁疾患の1つで、10代で失明する疾患)に対し、米国と英国でアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた遺伝子治療が実施され、治療前に比べ治療後に視機能が改善する症例も存在することが報告された。2012年になって、ES細胞から網膜・網膜色素上皮に分化させた組織を移植片として用いた黄斑ジストロフィ、萎縮型加齢黄斑変性に対する臨床応用も米国で実施された。しかしながら、現時点で、網膜色素変性に対する根本治療が存在しない中で、原因遺伝子の構造異常や変異遺伝子の発現を調べることは、病態解明につながるだけでなく、分子レベルでの予防法・治療法開発の発展へ向け極めて重要であると考えられる。

#### 2. 研究の目的

網膜色素変性は、本邦における失明原因の上位に位置し、治療法の開発が急務でありながら、現在、決定的な治療方法が確立していない難病である。2008年、*RPE65* 遺伝子変異をもつ Leber 先天盲(網膜色素変性類縁疾患)に対し、網膜色素変性に対する遺伝子治療の可能性が有望視されるようになった。しかし、網膜色素変性の原因は多岐にわたり、原因となる遺伝子変異を特定することは困難である。本研究は、網膜色素変性とその類縁疾患に対し、候補遺伝子の分子遺伝学的アプローチにより、原因となる遺伝子変異を検出・特定し、表現型との関連性、ハプロタイプ、変異遺伝子の発現レベルについて明らかにすることを目的とした。

#### 3. 研究の方法

研究代表者は、遺伝性網脈絡膜疾患に対する遺伝子解析研究について学内倫理委員会の承認を受けている。これまでに常染色体優性網膜色素変性や常染色体劣性網膜色素変性の約150症例のゲノムDNAを抽出した。本研究で、症例数を増やしながら、常染色体優性および常染色体劣性網膜色素変性に関する遺伝子(研究期間中に新たに発見された原因遺伝子)について、PCR法を用いた直接塩基配列法、次世代シーケンサを用いた全エクソーム解析法、家系調査による家族メンバーの臨床像・遺伝学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

1) 網膜色素変性は、遺伝的異質性をもつ網膜ジストロフィの1つである。常染色体優性網膜色素変性の10家系に対し、次世代シーケンサを用いたエクソーム解析法を行い、2家系で*RHO* 遺伝子変異(p.W126L, p.A346P)を突き止めp.W126Lは新規変異であった。また、p.W126L変異をもつ変異ロドプシン立体構造について検討した結果、特に明順応下で立体構造転移を示しロドプシン機能障害を引き起こすと考えられた。

2) 常染色体劣性網膜色素変性で頻度の高い遺伝子変異を探索する目的で、30例・発端者に対して、次世代シーケンサを用いたエクソーム解析を行った。その結果、4例で*CNGA1* 変異が検出された。さらに69例で*CNGA1* 遺伝子解析を行ったところ1例で遺伝子変異が検出され、本研究から常染色体劣性網膜色素変性の5.1% (5/99)が*CNGA1* 遺伝子異常によることが示された。

3) レーベル先天黒内障の遺伝学的特徴を明らかにする目的で、5例・発端者に対して、次世代シーケンサを用いたエクソーム解析を行った結果、2例で*RPE65* 変異が検出された。症例1で複合ヘテロ接合変異(p.H59Q and p.D62X)が、症例2でホモ接合変異(p.R515W)が検出された。本研究で、3種類の*RPE65* 変異が日本人レーベル先天黒内障の原因となっていることを明らかにした。

#### 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 23件)

1) Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Nakao A, Sato T, Utsumi T, et al. Novel mutations in enhanced S-cone syndrome. *Ophthalmology* 2013; 120: 431. e1-6. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.08.032

2) Okuno T, Hayashi T, Sugasawa J, Oku H, Yamada H, Tsuneoka H, et al. Elderly case of pseudo-unilateral occult macular dystrophy with Arg45Trp mutation in *RP11L1* gene. *Doc Ophthalmol* 2013; 127: 141-6. doi: 10.1007/s10633-013-9384-z

3) Katagiri S, Yoshitake K, Akahori M, Hayashi T, Furuno M, Nishino J, et al. Whole-exome sequencing identifies a novel *ALMS1* mutation

- (Q2051X) in two Japanese brothers with Alström Syndrome. *Mol Vis* 2013 ; 19 : 2393-406. URL: <http://www.molvis.org/molvis/v19/2393/>
- 4) Katagiri S ,Gekka T ,Hayashi T ,Ida H ,Ohashi T , Eto Y , et al. *OAT* mutations and clinical features in two Japanese brothers with gyrate atrophy of the choroid and retina. *Doc Ophthalmol* 2014 ; 128 : 137-48. doi: 10.1007/s10633-014-9426-1
- 5) Katagiri S , Akahori M , Hayashi T , Yoshitake K , Gekka T , Ikeo K , et al. Autosomal recessive cone-rod dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the *EYS* gene. *Doc Ophthalmol* 2014 ; 128 : 211-7. doi: 10.1007/s10633-014-9435-0
- 6) Takahashi H ,Hayashi T ,Tsuneoka H ,Nakano T , Yamada H , Katagiri S , et al. Occult macular dystrophy with bilateral chronic subfoveal serous retinal detachment associated with a novel *RP11* mutation (p.S1199P). *Doc Ophthalmol* 2014 ; 129 : 49-56. doi: 10.1007/s10633-014-9443-0
- 7) Ohkuma Y , Hayashi T , Yoshimine S , Tsuneoka H , Terao Y , Akiyama M , et al. Retinal ganglion cell loss in X-linked adrenoleukodystrophy with an *ABCD1* mutation (Gly266Arg). *Neuroophthalmology* 2014 ; 38 : 331-5. doi: 10.3109/01658107.2014.950430
- 8) Gocho K , Kameya S , Akeo K , Kikuchi S , Usui A , Yamaki K , (Hayashi T) et al. High-resolution imaging of patients with Bietti crystalline dystrophy with *CYP4V2* mutation. *J Ophthalmol* 2014 ; 2014 : 283603. doi: 10.1155/2014/283603
- 9) Katagiri S , Akahori M , Sergeev Y , Yoshitake K , Ikeo K , Furuno M , (Hayashi T) et al. Whole exome analysis identifies frequent *CNGA1* mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *PLoS One* 2014 ; 30 ; 9(9) : e108721. doi: 10.1371/journal.pone.0108721
- 10) Katagiri S , Hayashi T , Akahori M , Itabashi T , Nishio J , Yoshitake K , et al. *RHO* mutations (p.W126L and p.A346P) in two Japanese families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Ophthalmol* 2014 ; 2014 : 210947. doi: 10.1155/2014/210947
- 11) Katagiri S ,Hayashi T , Yoshitake K , Sergeev Y , Akahori M , Furuno M , et al. Congenital achromatopsia and macular atrophy caused by a novel homozygous *PDE6C* mutation (p.E591K) . *Ophthalmic Genet* 2015 ; 36 : 137-44. doi: 10.3109/13816810.2014.991932
- 12) Katagiri S , Hayashi T , Takeuchi T , Yamada H ,Gekka T ,Kawabe K ,et al. Somatic instability of expanded CAG repeats of *ATXN7* in Japanese patients with spinocerebellar ataxia type 7. *Doc Ophthalmol* 2015 ; 130 : 189-95. doi: 10.1007/s10633-015-9488-8
- 13) Ito N , Kameya S , Gocho K , Hayashi T , Kikuchi S ,Katagiri S ,et al. Multimodal imaging of a case of peripheral cone dystrophy. *Doc Ophthalmol* 2015 ; 130 : 241-51. doi: 10.1007/s10633-015-9490-1
- 14) Katagiri S , Hayashi T , Ohkuma Y , Sekiryu T ,Takeuchi T ,Gekka T ,et al. Mutation analysis of *BEST1* in Japanese patients with Best's vitelliform macular dystrophy. *Br J Ophthalmol* 2015 ; 99 : 1577-82. doi:

10.1136/bjophthalmol-2015-306830

15) Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Gekka T, et al. Novel *C8orf37* mutations in patients with early-onset retinal dystrophy, macular atrophy, cataracts, and high myopia. *Ophthalmic Genet* 2016; 37: 68-75. doi: 10.3109/13816810.2014.949380

16) Katagiri S, Hayashi T, Kondo M, Tsukitome H, Yoshitake K, Akahori M, et al. *RPE65* mutations in two Japanese families with Leber congenital amaurosis. *Ophthalmic Genet* 2016; 37: 161-9. doi: 10.3109/13816810.2014.991931

17) Nakanishi A, Ueno S, Hayashi T, Katagiri S, Kominami T, Ito Y, et al. Clinical and genetic findings of autosomal recessive bestrophinopathy in Japanese cohort. *Am J Ophthalmol* 2016; 168: 86-94. doi: 10.1016/j.ajo.2016.04.023

18) Kondo H, Matsushita I, Nagata T, Hayashi T, Kakinoki M, Uchino E, et al. Epidemiology of retinal detachment in patients with Stickler syndrome associated with *COL2A1* gene mutations. *Hum Genome Var* 2016; 3: 16018. doi: 10.1038/hgv.2016.18

19) Fujinami K, Kameya S, Kikuchi S, Ueno S, Kondo M, Hayashi T, et al. Novel *RPILI* variants and genotype-photoreceptor microstructural phenotype associations in cohort of Japanese patients with occult macular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57:4837-46. doi: 10.1167/iovs.16-19670

20) Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Mishima H, Tsuneoka H, Tsunoda K, et al. New truncation mutation of *NR2E3* gene in patient with enhanced S-cone syndrome. *Jpn J*

*Ophthalmol* 2016;60:476-85. DOI:

10.1007/s10384-016-0470-0

21) Katagiri S, Hayashi T, Gekka T, Tsuneoka H. A novel homozygous *CYP4V2* variant (p.S121Y) associated with a choroideremia-like phenotype. *Ophthalmic Genet* (in press) doi.org/10.1080/13816810.2016.1193880

22) Gocho K, Akeo K, Itoh N, Kameya S, Hayashi T, Katagiri S et al. High resolution adaptive optics retinal image analysis at early-stage central areolar choroidal dystrophy with *PRPH2* mutation. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2016;47:1115-26. doi:10.3928/23258160-20161130-05

23) Hayashi T, Gekka T, Tsuneoka H. Spontaneous resolution of large macular retinoschisis in enhanced S-cone syndrome. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2016; 47: 187-90. doi:10.3928/23258160-20160126-15

〔学会発表〕(計 19件)

1) 林孝彰. 教育講演 「遺伝性網膜疾患-基礎と臨床-」 その他の網膜変性の診断. 第117回日本眼科学会総会 2013年4月 東京

2) 林孝彰、片桐聡、内海智博、月花環、山田尚、赤堀正和、岩田岳、常岡寛. *PRPH2* 遺伝子変異(C250G)を認めた常染色体優性網膜色素変性2家系のハプロタイプ解析. 第117回日本眼科学会総会 2013年4月 東京

3) Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Tsuneoka H, Shimomura Y. Blue-on-yellow electroretinography on patients with enhanced S-cone syndrome. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* (Seattle, USA) 2013 May

4) 片桐聡、林孝彰、伊藤直子、月花環、岩田岳、常岡寛. Alström 症候群の兄弟例. 第 61 回日本臨床視覚電気生理学学会, 2013 年 10 月 大阪

5) 林孝彰. 網膜色素変性とその類縁疾患に対する遺伝子診断. 第 61 回日本臨床視覚電気生理学学会, 第 9 回 JRPS 網脈絡膜変性フォーラム, 2013 年 10 月 大阪

6) 林孝彰. 網膜色素変性とその類縁疾患に対する遺伝子診断の最前線. シンポジウム「遺伝性網膜疾患、最新の genotyping」第 62 回日本臨床視覚電気生理学学会, 2014 年 10 月 東京

7) 中西絢美、上野真治、林孝彰、片桐聡、岩田岳、寺崎浩子. Autosomal Recessive Bestrophinopathy の 2 家系. 第 119 回日本眼科学会総会 2015 年 4 月 札幌

8) Nakaminishi A, Ueno S, Hayashi T, Katagiri S, Iwata T, Terasaki H. Biallelic mutation of BEST1 causes ARB with varying degrees of severity in two Japanese families. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (Colorado, USA) 2015 May

9) 林孝彰. サブスペシャリティサンデー「小児眼底疾患のアップデート」網膜変性・遺伝性疾患. 第 120 回日本眼科学会総会 2016 年 4 月 仙台

10) 林孝彰. シンポジウム「遺伝性網脈絡膜変性疾患の遺伝型と臨床型」遺伝性錐体機能不全の遺伝型と臨床型. 第 120 回日本眼科学会総会 2016 年 4 月 仙台

11) Gocho K, Akeo K, Ito N, Hayashi T, Kubota

D, Kameya S, Yamaki K, Takahashi H.

Comparison of two sampling methods for assessing the cone mosaic in adaptive optics retinal images. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (Seattle, USA) 2016 May

12) Nakanishi A, Ueno S, Kominami T, Ito Y, Hayashi T, Katagiri S, Iwata T, Terasaki H. Diminished density of cone photoreceptors in fovea of eyes with autosomal recessive bestrophinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (Seattle, USA) 2016 May

13) Kondo H, Uchio E, Hayashi T, Nishina S, Azuma N, Kusaka S. Roles of genes in phenotypic diversity and intraocular asymmetry in patients with familial exudative vitreoretinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (Seattle, USA) 2016 May

14) 林孝彰、片桐聡、月花環、稲垣秀人、倉橋浩樹、常岡寛. 家族歴聴取を契機に診断された S 錐体 1 色覚の 1 家系. 第 64 回日本臨床視覚電気生理学学会, 2016 年 9 月 三重

15) 林孝彰. シンポジウム「診断に苦慮した症例・珍しい症例」眼底に白点がみられた 2 例. 第 64 回日本臨床視覚電気生理学学会, 2016 年 9 月 三重

16) 林孝彰. フェアウェルクルズス「診断の難しい網膜・視神経疾患」視神経疾患の診断は難しい 第 64 回日本臨床視覚電気生理学学会, 2016 年 9 月 三重

17) 林孝彰. 網膜色素変性の遺伝子異常と遺伝子解析について. 第 11 回 JRPS 網脈絡膜変

性フォーラム, 2016 年 9 月 三重

18) Matsushita I, Hayashi T, Kimoto K, Kubota T, Ohji M, Kusaka S, Kondo H. Foveal hypoplasia in patients with Stickler syndrome. American Academy of Ophthalmology (Chicago, USA) 2016 Oct

19) 林孝彰、笹野紘之、吉田希望、片桐聡、角田和繁、常岡寛. *OPA1* 遺伝子欠失を認めた常染色体優性視神経萎縮の家系. 第 70 回 日本臨床眼科学会, 2016 年 11 月 京都

〔図書〕(計 8 件)

1) 林孝彰. 視機能障害 中途疾患 網膜色素変性. 伊藤利之, 江藤文夫, 木村彰男編. 今日のリハビリテーション指針. 東京: 医学書院, 2013: 374-7.

2) 林孝彰. 視機能障害 先天疾患 全色盲. 伊藤利之, 江藤文夫, 木村彰男編. 今日のリハビリテーション指針. 東京: 医学書院, 2013: 382-3.

3) 林孝彰. 優性遺伝性視神経萎縮. 敷島敬悟編. 神経眼科診断クローズアップ. 東京: メジカルビュー社, 2014: 48-51.

4) 林孝彰. 小口病. 山本修一, 近藤峰生, 新井三樹, 篠田啓, 町田繁樹編. 新版どうとる? どう読む? ERG. 東京: メジカルビュー社, 2015: 98-9.

5) 林孝彰. 卵黄状黄斑ジストロフィ (Best 病). 山本修一, 近藤峰生, 新井三樹, 篠田啓, 町田繁樹編. 新版どうとる? どう読む? ERG. 東京: メジカルビュー社, 2015: 106-7.

6) 林孝彰. 専門外来での診療. 吉村長久, 村上晶編. 網膜変性疾患診療のすべて. 東京:

医学書院, 2016:120-6.

7) 林孝彰. 全色盲. 吉村長久, 村上晶編. 網膜変性疾患診療のすべて. 東京: 医学書院, 2016:754-7.

8) 林孝彰. 遺伝子検査. 飯田知弘, 近藤峰生, 中村誠, 山田昌和編. 眼科検査ガイド 第 2 版. 東京: 文光堂, 2016:754-7.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし。

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

林 孝彰 (HAYASHI, Takaaki)  
東京慈恵会医科大学・眼科学・准教授  
研究者番号: 10297418

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )