

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861662

研究課題名(和文) 治療導入を目標とした黄斑部遺伝性疾患に対する臨床診断ならびに分子遺伝生物学的解析

研究課題名(英文) Investigation of clinical and molecular genetic characteristics of inherited macular diseases for treatment approach

研究代表者

藤波 芳(Fujinami, Kaoru)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・視覚生理学研究室・研究員

研究者番号：60646206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では黄斑部遺伝性疾患を対象に、臨床的、分子遺伝生物学的所見を元に、病態生理に即した治療導入の準備体制確立を行った。集積症例は2015年3月までに143家系167症例で、29家系について遺伝学的診断が得られ、内訳はRP1L1(17家系)、ABCA4(3)、BEST1(2)、GUCA1A(2)、GUCY2D(2)、ADAMTS18(1)、PDE6C(1)、RPGR(1)であった。RP1L1網膜症について有意な遺伝子型表現型関連は示されなかったが、ABCA4については、英国との連携の元、有意な遺伝子型表現型関連が確認され、治療導入が検討されている。

研究成果の概要(英文)：We studied the clinical and molecular genetic characteristics of inherited macular diseases for treatment approaches. The cohort established till March of 2015 included 167 subjects from 143 families; occult macular dystrophy (64 families), cone (-rod) dystrophy (42), Stargardt disease (34), and Best disease (3). Genetic diagnosis was obtained in 29 families; 17 families with RP1L1, 3 with ABCA4, 2 with BEST1, 2 with GUCA1A, 2 with GUCY2D, 1 with ADAMTS18, 1 with PDE6C, and 1 with RPGR. In the two subsets with RP1L1-related retinal disease and ABCA4-related retinal disease, the genotype-phenotype association was studied. There was no significant association between disease severity and types of mutations in RP1L1-related retinal disease. A significant genotype-phenotype association was revealed in ABCA4-related retinal disease in collaboration with a British team, suggesting the treatment approaches are recommended for such patients.

研究分野：眼遺伝学

キーワード：遺伝性網膜疾患 黄斑部遺伝性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性網膜疾患は本邦において三大中途失明原因のひとつに数えられ、患者数は本邦で約5万人、世界では約300万人と推定されている。遺伝子異常が主たる疾患原因として存在するため、昨今まで治療が極めて困難とされてきた。

黄斑部遺伝性疾患は、「眼の心臓」ともいえる網膜の中でも視力に直結する部分、「黄斑部」が障害される遺伝性疾患であり、遺伝性網膜疾患の中において高頻度である。若年期より視力不良を来す疾患が多く、患者生活の質 (Quality of life; QOL) もしくは視覚の質 (Quality of vision; QOV) に多大な影響を及ぼしており、有効な治療方法はないとされてきた。

しかしながら、分子遺伝生物学的研究の発展に伴い、遺伝子治療、薬物治療、再生医療で得られた網膜色素上皮細胞移植、人工網膜移植などが考案され、欧米において臨床治験の段階にある。

本邦においては、治療導入を目標とした臨床診断ならびに分子遺伝学診断までプロセスが確立されておらず、本研究を通してそれらが実現され、難治性である黄斑部遺伝性疾患の病態生理が正しく理解され、治療導入への準備体制が確立される事が望まれる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は黄斑部遺伝性疾患を対象に、電気生理学的アプローチを用いた臨床診断ならびに、治療を目標とした遺伝子解析を行い、遺伝性網膜疾患の病態生理学的理解を深め、治療を推進することである。

治療導入に最も重要なプロセスとなる遺伝子型表現型関連解析、治療導入の検討については同分野で先駆的存在とされる英国モアフィールド眼科病院との連携で行い、グローバルな視野に立ち、黄斑部遺伝性疾患の治療推進を行う。

## 3. 研究の方法

対象は2013年4月より2015年3月までの2年間に東京医療センター眼科診療部で黄斑部遺伝性疾患と診断された全患者ならびにその家族とした。他施設からの紹介症例についても、東京医療センター眼科診療部において臨床データに基づいた臨床診断が行われた。

臨床検査には、発症年齢調査、視力・視野等の自覚検査、蛍光眼底造影、自発蛍光撮影を含む眼底所見、フーリエドメイン光干渉断層計 (OCT) を用いた網膜形態学的所見、黄斑部局所網膜電図 (局所 ERG) を中心とする電気生理学的所見を用い、遺伝性黄斑疾患の臨床診断の確定とともに、疾患重症度や病期、臨床病態が詳細に評価された。

電気生理学的所見を含めた臨床所見をもとに各症例は黄斑部遺伝性疾患のサブカテゴリーであるオカルト黄斑ジストロフィ、錐体 (桿体) ジストロフィ、スターガルト、ベスト病に分類された。

臨床診断と並行して患者末梢血より採取された DNA をもとに、*RP1L1*、*ABCA4*、*BEST1*、*GUCA1A*、*GUCY2D*、*ADAMTS18*、*PDE6C*、*RPGR* などの遺伝子について Next generation sequencing technique (whole Exome sequencing) を用いて網羅的検索を行った。オカルト黄斑ジストロフィと診断された症例については *RP1L1* を direct sequencing を用いて初期スクリーニングし、確定変異が得られなかった場合に high throughput genetic screening を行った。

患者 DNA より得られた候補変異に対して、同一家族内採血検体を用いて direct sequencing による co-segregation analysis を行い、確定遺伝子同定を行った。

症例数が比較的多いと予想された *RP1L1* 関連網膜症、*ABCA4* 関連網膜症については遺伝子型表現型関連解析が行われた。*ABCA4* 関連網膜症については十分な症例数を確保する為、英国モアフィールド眼科病院との連携の元、国際コホートをを用いて解析が行われた。また、得られた遺伝子型表現型関連解析の結果を元に各症例における治療導入の検討が行われた。

## 4. 研究成果

### (1) 黄斑部遺伝性疾患コホート

2 年間で集積された総症例数は2015年3月時点で143家系167症例であり、コホートの内訳はオカルト黄斑ジストロフィ64家系74症例、錐体 (桿体) ジストロフィ42家系48症例、スターガルト病34家系40症例、ベスト病3家系5症例であった。

### (2) 分子遺伝学的解析

143家系167症例については研究の目的、予想される利益不利益についての説明を行い、十分の理解・納得を得た上で、末梢血採血を行い、DNAを抽出した。オカルト黄斑ジストロフィ64家系74症例については初期診断の為の *RP1L1* 遺伝子全4 exons に対して、*primordial direct sequencing* が行われ、*RP1L1* negative 症例に対しては、whole Exome sequencing を行った。オカルト黄斑ジストロフィ以外のサブカテゴリーに分類された79家系93症例については whole Exome sequencing を行った。

### (3) 分子遺伝学的確定診断

上記143家系のうち、29家系について分子遺伝学的確定診断が得られ、*RP1L1* (17家系)、*ABCA4* (3家系)、*BEST1* (2家系)、*GUCA1A* (2家系)、*GUCY2D* (2家系)、*ADAMTS18* (1家系)、*PDE6C* (1家系)、*RPGR* (1家系) という結果に至

った。

RP1L1 陽性症例の表現型は全 17 家系においてオカルト黄斑ジストロフィであった。さらに、*ABCA4* 陽性 3 家系の表現型はスターガルト病、*BEST1* 陽性 2 家系はベスト病であった。他方で、錐体（桿体）ジストロフィの原因遺伝子は多岐にわたり *GUCA1A*、*GUCY2*、*ADAMTS18*、*PDE6C*、*RPGR* が同定された。

#### (4) 遺伝子型表現型関連解析

症例数の比較的多い *RP1L1*、*ABCA4* について遺伝子型表現型関連解析が行われた。*RP1L1* 遺伝子異常に起因するオカルト黄斑ジストロフィについては遺伝子変異の種類・部位と臨床像の顕著な関連は示されなかった。一方で、*ABCA4* 遺伝子異常に起因するスターガルト病については、英国モアフィールド眼科病院との連携の元、有意な遺伝子型表現型関連が確認され、重症遺伝子型を有する症例が早期発症・重度進行性の臨床像を呈する事が示された（文献 1-6）。

#### (5) 治療導入の検討

本研究において有意な遺伝子型表現型関連が得られた *ABCA4* 遺伝子異常に起因するスターガルト病の重症例に対して、レンチウイルスを用いた遺伝子治療 (gene replacement therapy)、再生医療で得られた網膜色素上皮細胞移植 (embryonic stem cell derived retinal pigment epithelial cell transplantation) による治療開始が、計症例に対しては視物質サイクル抑制薬 (visual cycle modification treatment) による治療開始が、それぞれ検討されている。

#### <引用文献>

1. Fujinami K, Lois N, Davidson AE, Mackay DS, Hogg CR, Stone EM, Tsunoda K, Tsubota K, Bunce C, Robson AG, Moore AT, Webster AR, Holder GE, Michaelides M\*. A longitudinal study of stargardt disease: clinical and electrophysiologic assessment, progression, and genotype correlations. *Am J Ophthalmol* 2013;15(6):1075-1088.
2. Fujinami K, Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Tsunoda K, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Michaelides M, Webster AR\*. The Clinical Effect of Homozygous *ABCA4* Alleles in 18 Patients. *Ophthalmology* 2013; 120 (11): 2324-31.
3. Fujinami K, Sergouniotis PI, Davidson AE, Wright G, Chana RK, Tsunoda K, Tsubota K, Egan CA, Robson AG, Moore AT, Holder GE, Michaelides M, Webster AR\*. Clinical and Molecular Analysis of Stargardt Disease with Preserved Foveal

#### Structure and Function.

*Am J Ophthalmol* 2013; 156(3): 487-501.e1.

4. Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, Tsunoda K, Ozawa Y, Tsubota K, Webster AR, Robson AG, Moore AT, Allikmets R\*, Michaelides M\*.

*ABCA4* Gene Screening by Next-Generation Sequencing in a British Cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54 (10): 6662-74.

5. Fujinami K, Lois N, Mukherjee R, MacBain VA, Tsunoda K, Tsubota K, Stone EM, Fitzke FW, Bunce C, Moore AT, Webster AR, Michaelides M\*.

A Longitudinal Study of Stargardt Disease: Quantitative Assessment of Fundus Autofluorescence, Progression and Genotype Correlations.

*Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54 (13): 8181-90.

6. Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, Tsunoda K, Ozawa Y, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Allikmets R, Michaelides M\*, Moore AT\*.

Clinical and Molecular Characteristics of Childhood-onset Stargardt Disease *Ophthalmology* 2015; 122(2):326-34.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Fujinami K, Lois N, Davidson AE, Mackay DS, Hogg CR, Stone EM, Tsunoda K, Tsubota K, Bunce C, Robson AG, Moore AT, Webster AR, Holder GE, Michaelides M\*.

A longitudinal study of stargardt disease: clinical and electrophysiologic assessment, progression, and genotype correlations.

*Am J Ophthalmol* 2013;15(6):1075-1088.

Fujinami K, Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Tsunoda K, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Michaelides M, Webster AR\*.

The Clinical Effect of Homozygous *ABCA4* Alleles in 18 Patients.

*Ophthalmology* 2013; 120 (11): 2324-31.

Fujinami K, Sergouniotis PI, Davidson AE, Wright G, Chana RK, Tsunoda K, Tsubota K, Egan CA, Robson AG, Moore AT, Holder GE, Michaelides M, Webster AR\*.

Clinical and Molecular Analysis of Stargardt Disease with Preserved Foveal Structure and Function.

Am J Ophthalmol 2013; 156(3): 487-501.e1.

. Fujinami K, Tsunoda K\*, Nakamura N, Kato Y, Noda T, Shinoda K, Tomita K, Hatase T, Usui T, Akahori M, Itabashi T, Iwata T, Ozawa Y, Tsubota K, Miyake Y. Molecular Characteristics of Four Japanese Cases with KCNV2-retinopathy: Report of Novel Disease-causing Variants. Mol Vis 2013; 19: 1580-90.

. Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, Tsunoda K, Ozawa Y, Tsubota K, Webster AR, Robson AG, Moore AT, Allikmets R\*, Michaelides M\*. ABCA4 Gene Screening by Next-Generation Sequencing in a British Cohort. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54 (10): 6662-74.

. Fujinami K, Lois N, Mukherjee R, MacBain VA, Tsunoda K, Tsubota K, Stone EM, Fitzke FW, Bunce C, Moore AT, Webster AR, Michaelides M\*. A Longitudinal Study of Stargardt Disease: Quantitative Assessment of Fundus Autofluorescence, Progression and Genotype Correlations. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54 (13): 8181-90.

. Fujinami K, Singh R, Carroll J, Zernant J, Allikmets R, Michaelides M, Moore AT\*. Fine Central Macular Dots Associated with Childhood-onset Stargardt Disease. Acta Ophthalmol 2014; 92(2): e157-9.

. Singh R, Fujinami K\*, Chen LL, Michaelides M, Moore AT. Longitudinal Follow-up of Siblings with a Discordant Stargardt Disease Phenotype. Acta Ophthalmol 2014; 92(4): e331-2.

. Singh R, Fujinami K\*, Moore AT. Branch Retinal Artery Occlusion Secondary to Prepapillary Arterial Loop. Retin Cases Brief Rep 2014; 8(2): 124-6.

. Yamazaki R, Tsunoda K\*, Fujinami K, Noda T, Tsubota K. Fundus autofluorescence imaging in a patient with the juvenile form of galactosialidosis. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina 2014; 45(3): 259-61.

. Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, Tsunoda K, Ozawa Y, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Allikmets R, Michaelides M\*, Moore AT\*.

Clinical and Molecular Characteristics of Childhood-onset Stargardt Disease Ophthalmology 2015; 122(2):326-34.

. Kato Y, Tsunoda K\*, Fujinami K, Iwata T, Saga M, Oguchi Y. Association of retinal artery and other inner retinal structures with distribution of tapetal-like reflex in Oguchi's disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015; in press.

: 中村奈津子、角田和繁、藤波芳、篠田啓、富田香、畑瀬哲尚、臼井聡、赤堀正和、岩田岳、三宅養三。10年以上の長期観察を行った「杆体反応の増強をともなう錐体ジストロフィー」4例。日本眼科学会雑誌 117(8):629-640,2013.

〔学会発表〕(計 24 件)

国際学会

Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting: Seattle, WA, U.S.A, 5-9 May 2013

: Fujinami K, Lois N, Mukhopadhyay R, McBain VA, Tsunoda K, Tsubota K, Fitzke FW, Moore AT, Webster AR, Michaelides M. A Longitudinal Study of Stargardt Disease: Quantitative Assessment of Fundus Autofluorescence, Progression and Genotype Correlations.

: Kato Y, Fujinami K, Nakamura N, Akahori M, Shinoda K, Tomita K, Hatase T, Usui T, Iwata T, Tsunoda K, Miyake Y. Clinical and Molecular Findings in Japanese Cases with KCNV2-retinopathy: Report of Novel Variants.

The International Society of Clinical Electrophysiology and Vision (ISCEV), 51th International Symposium, Chongqing, China, October 13-17 2013

: Fujinami K, Sergouniotis PI, Tsunoda K, Tsubota K, Robson AG, Moore AT, Michaelides M, Webster AR, Holder GE. Clinical and Molecular Analysis of Stargardt Disease with Preserved Foveal Structure and Function.

: Goto S, Fujinami K, Akahori M, Iwata T, Noda T, Miyake Y, Tsunoda K. Clinical and Molecular Analysis of Macular Dystrophy with Preserved Foveal Structure and Function.

World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology, Tokyo, Japan, 2-6 April 2014

: Kato Y, Fujinami K, Noda T, Miyake Y, Tsunoda K.  
Fundus Manifestations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (Rendu-Osler-Weber Disease).

: Iehisa I, Fujinami K, Nakamura N, Noda T, Tsunoda K.  
Siblings with Childhood-Onset Stargardt Disease Associated with External Limiting Membrane Thickening.

ARVO Annual Meeting: Orlando, Florida, U.S.A, 3-7 May 2014

: Fujinami K, Zernant J, Ozawa Y, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Webster AR, Allikmets R, Michaelides M, Moore AT.  
Clinical and Genetic Characteristics of Childhood-onset Stargardt Disease.

: Kato Y, Fujinami K, Noda T, Akahori M, Iwata T, Miyake Y, Tsunoda K.  
A Case of Occult Macular Dystrophy with Foveal Detachment by Vitreomacular Traction.

ISCEV 52nd International Symposium, Boston, Massachusetts US, 20-24 July 2014

: Fujinami K, Zernant J, Robson AG, Tsunoda K, Ozawa Y, Tsubota K, Allikmets R, Michaelides M, Moore AT, Holder GE.  
Clinical and Genetic Characteristics of Childhood-onset Stargardt Disease.

: Kato Y, Tsunoda K, Fujinami K, Noda T, Oguchi Y.  
Novel Fundusoscopic Features in Oguchi's Disease; Relationship between Retinal Arteries and Golden Metallic Reflex.

: Hirakata T, Fujinami K, Kato Y, Nakamura N, Noda T, Hirakata A, Ueno S, Ohguro H, Miyake Y, Tsunoda K.  
Unilateral Cone-rod Dysfunction associated with Electronegative bright flash Electroretinography.

#### 国際招待講演

: Retina updated meeting, Chongqing China, 10 October 2013

Fujinami K.

Genotype-phenotype correlations in Inherited Retinal Disease.  
Southwest Eye Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, China.

: Ophthalmic Genetics Conference, Ljubljana Slovenia, 25 October 2013

Fujinami K.  
Phenotype and Genotype of Stargardt Disease -updated-.  
Ljubljana University Medical Centre, Ljubljana, Slovenia.

: Electrophysiology Course, Pavia, Italy, 28 October 2013

Fujinami K.  
Genotype-Phenotype Correlation in Macular Dystrophy.  
San Matteo Hospital, Pavia, Italy.

: Medical Retina Meeting, Monza, Italy, 29 October 2013

Fujinami K.  
Genotype-Phenotype Correlation in Inherited Retinal Disease.  
San Gerardo Hospital, Monza, Italy.

: Genetic Conference, New York, NY, USA, 29 July 2014

Fujinami K.  
ABCA4-related retinal disorder -up to date-  
Edward Howkins Institute, Columbia University, New York, NY, USA.

: Asia-ARVO 2015, Yokohama, Japan, 16-19, February, 2015

Fujinami K.  
Stargardt Disease with Foveal Sparing Phenotype.  
Special Interest Group 4 Mechanism of Retinal Degeneration.

#### 国内学会

第 61 回日本臨床視覚電気生理学学会、大阪、2013/10/4-10/5

: 中村奈津子、藤波芳、野田徹、松永達雄、加賀君孝、林孝彰、角田和繁。  
Auditory Neuropathy を伴う常染色体優性視神経萎縮症の 1 例。

: 加藤悠、藤波芳、野田徹、赤堀正和、岩田岳、三宅養三、角田和繁。

硝子体牽引にともない中心窩に局所的網膜剥離を来したオカルト黄斑ジストロフィーの1例.

第67回日本臨床眼科学会、横浜、  
2013/10/31-11/3

: 山崎梨沙、藤波芳、野田徹、角田和繁.  
眼底自発蛍光において黄斑部に著明な過蛍光を認めたガラクトシアリドーシスの1例.

第62回日本臨床視覚電気生理学学会、東京、  
2014/10/3-10/4

②1: 藤波芳、後藤総、赤堀正和、小沢洋子、坪田一男、野田徹、岩田岳、三宅養三、角田和繁.  
中心窩機能温存型黄斑ジストロフィー.

②2: 中村奈津子、藤波芳、野田徹、岩田岳、角田和繁.  
GUCY2D 遺伝子変異を伴う錐体杆体ジストロフィーの2例

第68回日本臨床眼科学会、神戸、  
2014/11/13-11/16

②3: 中村奈津子、藤波芳、水野嘉信、野田徹、角田和繁.  
簡易型フリッカー網膜電位計(レチバル)による錐体機能評価.

国内招待講演

②4: 第3回日本視野学会学術集会、東京、  
2014/6/28-6/29

藤波芳.  
黄斑ジストロフィー～機能・構造異常からみる病態生理～  
シンポジウムⅠⅠ「機能と構造の評価、その最前線」

〔図書〕(計8件)

: 藤波芳.  
黄斑部遺伝性疾患の臨床診断と遺伝性治療を目標とした分子遺伝学的解析.  
医科学応用研究財団研究報告 30:148-156, 2013

: 角田和繁、藤波芳.  
【眼底自発蛍光と網膜臨床】黄斑ジストロフィーと自発蛍光.  
眼科 55(9):1003-1008, 2013.

: 藤波芳.  
電気生理学的検査 黄斑部局所 ERG.  
眼科 56(4):511-521, 2014.

: 角田和繁、藤波芳.  
【眼と遺伝】黄斑ジストロフィー(三宅病を含めて).  
眼科 56(5):575-584, 2014.

: 藤波芳、中村奈津子.  
IV どう読む? /先天性疾患 錐体(杆体)ジストロフィー  
新版 どうとる? どう読む? ERG 92-95, 2015.

: 藤波芳.  
IV どう読む? /先天性疾患 Stargardt 病 (ABCA4-related retinal disease)  
新版 どうとる? どう読む? ERG -104-105, 2015.

: 藤波芳.  
硝子体・網膜病変の診かた - 私はこう診る - / 1. 症状と鑑別診断 5) 羞明・昼盲の鑑別疾患.  
眼科 57(4):575-584, 2015.

: 藤波芳.  
硝子体・網膜病変の診かた - 私はこう診る - / 3. 所見と病態 3) Stargardt 病  
眼科 57(4):624-640, 2015.

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕  
無

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
藤波芳 (FUJINAMI Kaoru)  
独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)  
研究者番号: 60646206

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者 無

(4) 研究協力者  
角田和繁 (Tsunoda Kazushige)  
岩田岳 (IWATA Takeshi)  
赤堀正和 (AKAHORI Masakazu)  
三宅養三 (MIYAKE Yozo)  
近藤峰生 (KONDO Mineo)  
Andrew Webster  
Anthony Moore