

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：13802
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26462659
研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いたわが国の網膜色素変性患者の遺伝子診断システムの構築

研究課題名(英文) Development of genetic diagnosis for Japanese Retinitis Pigmentosa patients using next generation sequencer

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性(RP)は遺伝的異質性が高い疾患である。我々は2名の日本人RPに対して遺伝学的特徴と臨床像の検討を行った。原因変異を同定する為、RPとレーバー先天盲の74個の原因遺伝子を対象として次世代シーケンサーを用いて変異探索を行った。また、眼科検査を継続的に行い、臨床評価を行った。結果、2症例とも夜盲で発症し、矯正視力は30歳前後において良好に保持されていた。視野は10歳代半ばまで良好に保持されていたが、以後急激に悪化し、20歳代で高度な求心性視野狭窄を示した。常染色体優性RPの原因遺伝子PRPF31の寄与が示唆された。RPの遺伝子診断に本研究で構築した遺伝子診断システムは有効であった。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa (RP) is a highly heterogeneous genetic disease. This study was conducted to investigate genetic and clinical features in 2 unrelated Japanese RP patients. To identify causative mutations, 74 genes known to cause RP or Leber congenital amaurosis were examined by targeted next-generation sequencing (NGS). Clinical analyses were based on ophthalmic examination, fundus photography, and electroretinography. Clinical courses were similar in both patients. The onset of nyctalopia occurred in the first decade. Fundus examination showed typical RP. Although visual acuity was relatively preserved even into the fourth decade, visual field areas exhibited rapid deterioration in their mid-teens, and subsequent severe concentric constriction in the third decade. Mutation analysis revealed both patients' conditions were due to PRPF31 mutations resulting in autosomal dominant RP. This study suggests that our targeted-NGS approach could be useful for genetic diagnosis for RP.

研究分野：眼科遺伝学

キーワード：網膜色素変性 次世代シーケンサー 遺伝子変異解析

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性(Retinitis Pigmentosa; 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・視力低下につながり、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、本邦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%)。わが国では、20世紀の初頭まで近親婚率が諸外国に比べて高かったため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。視力、視野の予後を遺伝形式別に比較するとX連鎖性が最も不良で、adRPは比較的良好な傾向を示す。

欧米や英国では網膜色素変性症の特殊型であるレーバー先天性黒内障(Leber's Congenital Amaurosis; LCA)の遺伝子治療がLCA患者に対して既に行われている。2009年には、LCA患者12名を対象にして、疾患原因遺伝子RPE65を組み込んだアデノウイルスベクター(AAV2.hRPE65v2)の網膜下注射の効果を調べた第一相試験結果が行われ、視機能の改善例が報告され、現在第三相試験が行われている。これら治験結果は、将来の網膜色素変性疾患の遺伝子治療のアプローチを示すものであり、そのためにもRPの原因遺伝子の特定が必須である。また、ロドプシンやRP9等、各種の遺伝子異常患者から作成したiPS細胞を用いて視細胞に分化させ、種々の薬物の効果を検討し、 α -Tocopherolは、RP9遺伝子異常の細胞の変性を抑制すると報告された。こうした遺伝子異常の明らかにな

ったRPを、治療によって視機能の改善または維持させるためには、比較的発症初期に治療に取りかかる必要があり、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の構築が重要である。

そこで本申請は、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、RP症例の収集を試み、わが国のRP患者に対して遺伝子変異を迅速かつ効率良く同定する事ができる遺伝子変異探索法の構築を目標とした。

2. 研究の目的

本申請は、我が国のRP患者に対して、次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer; NGS)を用いた迅速かつ効率の良い変異探索法を構築し、臨床の場で遺伝子検査として一般化する為のシステム化を目的とする。また、本研究により得られた変異データを用いて、早期発見、予後予測、治療方針の決定や遺伝相談への臨床応用を行う。

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)を行った。患者より検体を採取する際に可能な限り家族の検体も同時に収集した。

(2) 次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンス解析

使用機器は、次世代シーケンサーMiSeq(イルミナ社)を使用した。変異解析する遺伝子は、遺伝性の網膜関連疾患の原因遺伝子データベースRetNet

(<https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>)を参考にし、2014年1月までに同定されていた74個の

RP または LCA の原因遺伝子を選択した。ターゲット領域のプローブはアジレント社のオンラインツール SureDesign

(<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/index.htm>)を用いて設計し、サンプルライブラリーの作成は、HaloPlex Target Enrichment kit(アジレント社)を使用した。MiSeq 用のシーケンス試薬は MiSeq Reagent Kit v2 300 cycle (イルミナ社)を使用した。

(3)変異の抽出法

NGS 解析により得られた膨大なデータから原因変異の検出を行うために専用の解析ソフトウェア(Genomics Workbench software package version 7.5.1; CLC bio 社)を用いた。

(4) 疾患原因変異の判定

原因変異を同定できた検体は PCR ダイレクトシーケンス法を用いて確認実験を行う。その後、家族の検体を利用して分離解析を行うと共に、他種生物での相同遺伝子のホモロジー解析、dbSNP データベース

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)、1000 ゲノムデータベース

(<http://www.1000genomes.org/>)、Exome Aggregation Consortium データベース

(<http://exac.broadinstitute.org/>)、Human Genetic Variation Browser データベース

(<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>)、Tohoku Medical Megabank Organization database (ToMMo)

(<https://ijgvd.megabank.tohoku.ac.jp/>)を用いて評価した。スプライス変異は、スプライス部位予測ソフトを用いてドナー/アクセプターサイトの影響を評価する。ミスセンス変異に関しては、

SIFT(http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html)、

PolyPhen2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、MutationTaster(<http://www.mutationtaster.org/>)

の 3 種類の *in silico* 解析を行いアミノ酸置換による病原性を評価した。

4 . 研究成果

浜松医科大学眼科で詳細な問診と眼科的検査により RP と診断された 2 症例(HM0046、HM0047)を対象としてターゲットシーケンス解析を実施した。

HM0046 は 24 歳の男性。HM0047 は 36 歳の男性で、経過観察期間はそれぞれ 17 年間(7 - 24 歳)と 30 年間(6 - 36 歳)であった。両者とも 10 歳前に夜盲の症状で始まり、眼底検査では、びまん性の網膜変性、骨小体様色素沈着や網膜血管狭窄といった典型的な網膜色素変性症の所見を呈した。全視野刺激網膜電図はあらゆる条件下で消失型を示した。眼底自発蛍光では網膜萎縮に相当する低蛍光を示した。光干渉断層計では、中心窩では比較的層構造は保たれていたが、中心窩周囲では網膜外層を中心に障害がみられた。矯正視力は 30 歳前後においても比較的良好に保持されていた。視野は 10 歳代半ばまでは比較的良好に保持されていたが、以後急激な悪化を示し、20 歳代において高度な求心性視野狭窄を示した。

MiSeq より出力されたデータから疾患原因変異の絞込みを行った結果、HM0046 より常染色体優性 RP の原因遺伝子 *PRPF31* に p.(R354*)のヘテロ接合変異を抽出した。また、HM0047 より *PRPF31* に p.(S145Pfs*8)のヘテロ接合変異を抽出した。

NGS による遺伝子診断の結果、上記患者らの原因遺伝子として *PRPF31* の寄与が示唆された。両症例は家族歴より常染色体劣性遺伝と推定したが、*PRPF31* 遺伝子異常による RP は、無症候キャリアが存在する事が報告されており、両症例の家族歴から常染色体優性の原因遺伝子を推測する事は困難であった。RP の遺伝子診断に本研究で構築した NGS を使用した遺伝子診断システムは有効であった。

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 8件)

Wang C, Hosono K, Kachi S, Suto K, Nakamura M, Terasaki H, Miyake Y, Hotta Y, Minoshima S. Novel *OPN1LW/OPN1MW* deletion mutations in 2 Japanese families with blue cone monochromacy, *Hum. Genome Var.* 査読有 3, 16011, 2016. Doi: 10.1038/hgv.2016.11.

Miyamichi D, Asahina M, Nakajima J, Sato M, Hosono K, Nomura T, Negishi T, Miyake N, Hotta Y, Ogata T, Matsumoto N. Novel *HPS6* mutations identified by whole-exome sequencing in two Japanese sisters with suspected ocular albinism, *J. Hum. Genet.* 査読有 61(9), 839-842, 2016. Doi: 10.1038/jhg.2016.56.

Yokoi T, Nishina S, Fukami M, Ogata T, Hosono K, Hotta Y, Azuma N. Genotype-phenotype correlation of the *PAX6* gene mutations in aniridia, *Hum. Genome Var.* 査読有 3, 15052, 2016. Doi: 10.1038/hgv.2015.52.

Hosono K, Harada Y, Kurata K, Hikoya A, Sato M, Minoshima S, Hotta Y. Novel *GUCY2D* gene mutations in Japanese male twins with Leber congenital amaurosis, 査読有 693468, 2015. Doi: 10.1155/2015/693468.

Zhao Y, Hosono K, Suto K, Ishigami C, Arai Y, Hikoya A, Hiramami Y, Ohtsubo M, Ueno S, Terasaki H, Sato M, Nakanishi H, Endo S, Mizuta K, Mineta H, Kondo M, Takahashi M, Minoshima S, Hotta Y. The first *USH2A* mutation analysis of Japanese autosomal recessive retinitis pigmentosa patients: a totally different mutation profile with the lack of frequent mutations found in Caucasian patients, *J Hum Genet.* 査読有

59 521-528 2014. Doi: 10.1038/jhg.2014.65.

Suto K, Hosono K, Takahashi M, Hiramami 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 25-34 2014. Doi: 10.3109/13816810.2013.768673

Wang C-X, 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 16-25 2014. Doi: 10.1002/cbin.10174.

Gao J, Ohtsubo M, Hotta Y, Minoshima S. Oligomerization of optineurin and its oxidative stress- or E50K mutation-driven covalent cross-linking: possible relationship with glaucoma pathology, *PLoS One* 査読有 9, e101206, 2014. 10.1371/journal.pone.0101206.

[学会発表](計 15件)

Hosono K, Minoshima S, Harada Y, Kurata K, Hikoya A, Sato M, Hotta Y. Japanese male twins with Leber congenital amaurosis possibly caused by the *GUCY2D* gene mutation, ICHG, 2016, Kyoto.

Ohtsubo M, Hotta Y, Minoshima S: The analysis of suppressive effects of citrus peel ingredient on the abnormal protein accumulation-related phenomena induced by mutant proteins of glaucoma and amyotrophic lateral sclerosis causative genes (*OPTN* and *TARDBP*), ICHG, 2016, Kyoto.

Hosono K, Wang C-X, Kachi S, Kurata K, Suto K, Nakamura M, Terasaki H, Miyake Y, Hotta Y, Minoshima S. Fine genomic analysis of deletion mutations in the locus control region of *OPN1LW/OPN1MW* genes

in 2 Japanese families with blue cone monochromacy, XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, 2016, Tokyo.

Kurata K, Tachibara N, Matsuoka T, Hosono K, Hikoya A, Ohashi Y, Sato M, Takahashi M, Hotta Y: A novel homozygous c.636delT mutation in SAG in a Japanese patient with retinal dystrophy, XVII International Symposium on retinal degeneration, 2016, Kyoto.

Hotta Y, Sato M, Nakajima J, Hosono K, Miyamichi D, Negishi T, Nomura T, Miyake N, Ogata T, Matsumoto N: Clinical Phenotype of Two Sisters with HPS6 Mutations Identified by Whole Exome Sequencing, WOC, 2016, Guadalajara.

Miyamichi D, Hotta Y, Nakajima J, Sato M, Hosono K, Negishi T, Nomura T, Imagawa E, Miyake N, Ogata T, Matsumoto N: HPS6 mutations identified by whole-exome sequencing in two sisters with ocular albinism, ISGEDR Meeting, 2015, Nova Scotia.

Suto K, Hosono K, Nagase Y, Nakanishi H, Mizuta K, Minoshima S, Hotta Y: Visual outcomes of Japanese patients with retinitis pigmentosa and Usher syndrome caused by USH2A Mutations, ARVO, 2015, Denver.

Ohtsubo M, Ohizumi Y, Hotta Y, Minoshima S: An in vitro analysis of the induction mechanism of the autophagy by a component chemical of citrus peel and its application to whole animal system, Asia ARVO 2015, Yokohama

Hotta Y, Sato M, Nakajima J, Hosono K, Miyamichi D, Negishi T, Nomura T, Miyake N, Ogata T, Matsumoto N: HPS6 mutations identified by whole-exome sequencing in two sisters with ocular albinism, Asia ARVO

2015, Yokohama.

Hosono K: Molecular genetics of retinitis pigmentosa in East Asian population, Symposium, "Genetics" WOC, 2014, Tokyo.

Wang C-X, Hosono K, Terasaki H, Hotta Y, Minoshima S: Fine analysis of the deletions in red/green opsin genes and the upstream locus control region (LCR) found in two Japanese families with blue cone monochromacy (BCM), WOC, 2014, Tokyo.

Hosono K, Zhao Y, Ishigami C, Ueno S, Nakanishi H, Terasaki H, Kondo M, Takahashi M, Minoshima S, Hotta Y: Mutation analysis of the USH2A gene in Japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa, ARVO, 2014, Orland.

Hosono K, Zhao Y, Suto K, Ishigami C, Arai Y, Hikoya A, Hiramami Y, Ohtsubo M, Ueno S, Terasaki H, Sato M, Nakanishi H, Endo S, Mizuta K, Mineta H, Kondo M, Takahashi M, Minoshima S, Hotta Y: The first USH2A mutation analysis of Japanese autosomal recessive retinitis pigmentosa patients: A totally different mutation profile with the lack of frequent mutations found in Caucasian patients. XVI International symposium on retinal degeneration, 2014, Pacific Grove.

Harada Y, Hosono K, Hikoya A, Minoshima S, Sato M, Hotta Y: A twin with Leber congenital amaurosis possibly caused by the GUCY2D gene mutation, AAPOS-JAPO-JASA Joint Meeting, 2014, Kyoto.

Yokoi T, Hosono K, Hotta Y, Nishina S, Azuma N: Mutations of the PAX6 gene in patients with aniridia, AAPOS-JAPO-JASA Joint Meeting, 2014, Kyoto.

〔図書〕(計 4件)

堀田喜裕、倉田健太郎、細野克博、遺伝性網膜変性疾患の遺伝子検査、**臨床眼科** 69(12), 1590-1595, 2015.

細野克博、堀田喜裕、眼と遺伝 2.網膜色素変性、**眼科** 56 569-574、2014.

細野克博、堀田喜裕、ゲノムと網膜関連疾患の関与を探索 網膜色素変性、**RETINA Medicine**, 3, 26-32, 2014.

堀田喜裕、眼科診療指針のパラダイムシフト 網膜硝子体 網膜遺伝病診療、**眼科** 56, 209-215, 2014.

〔産業財産権〕

○取得状況(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: 第5828499号

取得年月日: 2015年10月30日

国内外の別: 国内

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

山本 修一 (YAMAMOTO SHUICHI)

千葉大学・医学部・教授

研究者番号: 20230550

寺崎 浩子 (TERASAKI HIROKO)

名古屋大学・医学部・教授

研究者番号: 40207478

蓑島 伸生 (MINOSHIMA SHINSEI)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号: 90181966

細野 克博 (HOSONO KATSUHIRO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60402260

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

倉田 健太郎 (KURATA KENTARO)