

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20253

研究課題名(和文) 先天白内障の病態解明のための3次元生体測定とデータベース構築

研究課題名(英文) 3D-analysis using biometric technology and the database construction for elucidating the pathological mechanism with congenital cataract

研究代表者

立花 信貴 (Tachibana, Nobutaka)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80647397

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)：サブテロメア微細構造異常症の一つである6p25欠失症候群として、右眼無虹彩症、左眼Peters奇形の両眼の早発型発達緑内障を発症した一例について検討した。症例は0歳女児。出生直後より両眼の角膜混濁を認め早発型発達緑内障を疑われた。緑内障の家族歴は認めなかった。疾患原因遺伝子を同定する為、PAX6遺伝子の全13エキソンについてサンガー法による変異解析を実施したが変異は同定出来なかった。さらに、次世代シーケンサーを使用して全エクソーム解析を実施した。結果、FOXC1遺伝子を含む6p25領域に約4Mbのde novoの欠失が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We report a case of 6p25 deletion syndrome, one of subtelomere microstructural abnormality, which is early-onset developmental glaucoma with right eye aniridia and left eye Peters anomaly. Case was 0-year old girl. Cornea opacity of both eyes was observed, suspected of early onset developing glaucoma. Familial history of glaucoma was not recognized. In order to identify disease-causing genes, mutation analysis by the Sanger method was performed on all 13 exons of the PAX6 gene, but the mutation could not be identified. Furthermore, we performed whole exome sequencing. Exome data suggested that a patient had a de novo deletion mutation in the 6p25 region containing the FOXC1 gene.

研究分野：眼科

キーワード：先天緑内障

1. 研究開始当初の背景

少子化の進むわが国において、小児眼疾患の視機能を良く保つことは必須である。先天白内障を代表とする遺伝性眼疾患は、小児の視力障害を起こす疾患として重要であるが、十分な研究がなされているとは言い難い。浜松医科大学と国立成育医療研究センターは、先天白内障を代表する遺伝性眼疾患の症例が集中しており、詳細な眼所見の検査や全身合併症を検討するのに既に多くの機器を整備している。遺伝子解析の体制も整っており、PAX6 を伴う先天白内障などで変異解析の実績がある。更に、光干渉断層計 (OCT) の臨床応用がはじまっており、いままで困難だった生体計測が可能になりつつある。

2. 研究の目的

本研究は、上記 2 施設を含む共同研究施設に通院している先天白内障を代表とする遺伝性眼疾患患者を収集し、原因遺伝子の変異解析、種々の機器を用いた精細な臨床所見に加えて、OCT による生体計測のデータを蓄積してわが国の遺伝性眼疾患研究の基盤とすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 症例の診断と検体収集

国立成育医療研究センター眼科、浜松医科大学眼科と共同研究施設に通院している先端白内障症例を対象とした。原因遺伝子の変異解析の為に各眼科外来で倫理規定に基づき、両親に遺伝子検査について十分な説明を行い、書面上で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) 原因遺伝子解析

PAX6 遺伝子の変異解析

PAX6 は無虹彩症や Peters 奇形の原因遺伝子である。それ故、PAX6 の全 13 エキソンについてサンガー法を用いて変異解析を行った。

次世代シーケンサー (NGS) を用いた全エクソーム解析

使用機器は、浜松医科大学の先進機器共用推進部の次世代シーケンサー NextSeq 500 (イルミナ社) を使用した。サンプルライブラリーの作成は、SureSelect Human All Exon kit (アジレント社) を使用した。NextSeq500 用のシーケンス試薬は NextSeq 500/550 High Output v2 Kit 300 cycle (イルミナ社) を使用した。

変異の抽出法

NGS より出力された大量のシーケンスデータは当教室で構築した専用のパイプラインを用いて解析した。研究分担者らは、NGS から出力された大量データを用いて変異を検出する手技や、検出した変異が疾患原因変異かどうかを評価する経験と実績がある。

疾患原因変異の判定

原因変異を同定できた検体はサンガー法を用いて確認実験を行った。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、収集済み健常コントロールでの解析、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 データベース

(<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>)、東北メガバンクデータベース

(<https://ijgvd.megabank.tohoku.ac.jp/>) を用

いて評価した。既報告の疾患原因変異は

Human Gene Mutation データベース

(<https://portal.biobase-international.com/cg>)

i-bin/portal/login.cgi)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した。新規のミスセンス変異は、SIFT(http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html)、PolyPhen2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、Mutation Taster(<http://www.mutationtaster.org/>)、CADD(<http://cadd.gs.washington.edu/>)の4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。コピー数異常の検討には専用ソフトウェアXHMM(eXome-Hidden Markov Model)を用いた。

【倫理面への配慮】

当該研究に関する遺伝子及び末梢血の収集にあたり、成育医療研究センター、浜松医科大学の倫理委員会(承認番号 686、EG14-040)の承認を受けている。末梢血は、同意を得た患者または保護者より提供を受けた。採血前に本研究の研究内容、協力の任意性と撤回の自由、研究計画書等の開示、個人情報保護、提供者の利益および不利益、解析結果の通知、研究成果の公表、研究終了後の試料等の取扱いの方針、知的財産権、費用、遺伝カウンセリング等について詳しく説明し、インフォームドコンセントを書面で得られたもののみを対象とした。本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)及び、「疫学研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省)を遵守して行った。

4. 研究成果

本研究では右眼無虹彩症、左眼 Peters 奇形の両眼の早発型発達緑内障を発症した1例について遺伝子解析を実施した。症例は0歳女児。出生直後より両眼の角膜混濁を認め早発型発達緑内障を疑い出生6日に岐阜大学眼科

に紹介となった。全身所見としては動脈管開存症・卵円孔開存症・心房中隔欠損、両側の難聴、右副耳、鞍鼻を認めた。緑内障の家族歴は認めず、また妊娠経過中に胎児に異常の指摘はなく母体の感染も無かった。疾患原因遺伝子を同定する為、PAX6 遺伝子の全13エキソンについてサンガー法による変異解析を実施したが変異は同定出来なかった。さらに、NGSを使用して全エクソーム解析を実施した。結果、FOXC1 遺伝子を含む6p25領域に約4Mbの*de novo*の欠失が示唆された。

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 1 件)

- (1) 永田裕衣、古森美和、立花信貴、澤田麻友、毛利剛司、田中恵子、堀田喜裕、原因不明の両視神経炎に対して血漿交換が有効であった1例、臨床眼科、査読有、70(1)、1151-1157、2016. doi: 10.11477/mf.1410211891.

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 松岡貴大、細野克博、立花信貴、彦谷明子、荒井優気、佐藤美保、高橋政代、堀田喜裕、SAG 遺伝子の636delTをホモ接合体で持つ網膜ジストロフィーの1例、第69回日本臨床眼科学会、2015年10月24日、名古屋
- (2) Kentaro Kurata, Nobutaka Tachibana, Takahiro Matsuoka, Katuhiro Hosono, Akiko Hikoya, Yuuki Ohashi, Miho Sato, Masayo Takahashi, Yoshihiro Hotta, A novel homozygous c.636delT mutation in SAG in a Japanese patient with retinal dystrophy, XVIIth International Symposium on Retinal Degeneration, 2016年9月19日、京都
- (3) 新美祐介、川瀬和秀、山本哲也、

山本崇裕、倉田健太郎、立花信貴、細野克博、堀田喜裕、FOXC1 遺伝子を含む 6p25 領域に欠失が示唆された早発型発達緑内障の 1 例、第 122 回日本眼科学会、2018 年 4 月 20 日、

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

立花 信貴 (TACHIBANA NOBUTAKA)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：8 0 6 4 7 3 9 7

(2)研究協力者

堀田 喜裕 (HOTTA YOSHIHIRO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：9 0 1 7 3 6 0 8

細野 克博 (HOSONO KATSUHIRO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：6 0 4 0 2 2 6 0

倉田健太郎 (KURATA KENTARO)

浜松医科大学・医学部・大学院生